

**THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE D'OBTENIR
LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ**

**ACTION DES PROTEASES
VEGETALES ET MICROBIENNES
SUR LES
PROTEINES DE L'ORGE**

**Présentée par
POL DELIZEE**

Soutenue le 6 avril 1973

COMPOSITION DU JURY:

M. R. GAY	Président
MM. L. CHAPON	} Examinateurs
CH. ALAIS	
CH. A. MASSCHELEIN	

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE D'OBTENIR
LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

**ACTION DES PROTEASES
VEGETALES ET MICROBIENNES
SUR LES
PROTEINES DE L'ORGE**

Présentée par
POL DELIZEE

Soutenue le 6 avril 1973

COMPOSITION DU JURY:

M.	R. GAY	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Président
MM.	L. CHAPON	.	.	.	.	.	.	.	.	.	} Examinateurs
	CH. ALAIS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	CH. A. MASSCHELEIN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	



Que Monsieur le Professeur Ch. A. MASSCHELEIN trouve ici un témoignage de ma profonde reconnaissance pour l'aide précieuse et généreuse qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Je remercie Monsieur le Professeur R. GAY de la bienveillante sympathie qu'il m'a manifestée durant l'élaboration de cette thèse.

De même que Messieurs les Professeurs Ch. ALAIS et L. CHAPON soient remerciés d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Enfin je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma femme, sans son aide, ses avis éclairés, cette étude n'aurait pu être menée à terme.

TABLE DES MATIERES

=====

I. Introduction	1
II. Revue bibliographique	3
A. Composés azotés	3
1. Classification générale	4
2. Les acides nucléiques	5
3. Les protéines et leurs produits de dégradation ...	7
a. Les protéines de l'orge	8
1. Extraction	9
2. Purification	9
3. Fractionnement	11
4. Caractérisation	13
b. L'azote soluble du malt	14
B. Les enzymes protéolytiques	18
1. Les enzymes protéolytiques de l'orge et du malt...	19
a. Les endopeptidases	20
1. Endopeptidases à groupe actif sérine	22
2. " " " thiol	23
3. " " " métallique ...	23
4. " du type pepsine	24
b. Les exopeptidases	25
1. Les carboxypeptidases	26
2. Les aminopeptidases	28
3. Les peptidases	29
2. Les protéases industrielles	31
a. Les protéases microbiennes	32
1. Protéases acides	32
2. Metalloprotéases neutres	33
3. Protéases alcalines à groupe sérine	33'
b. Les protéases végétales	34
1. La papaïne	34
3. Les inhibiteurs	36
a. Les inhibiteurs à faible poids moléculaire	37
b. " " " poids moléculaire élevé.....	38
1. L'inhibiteur des endopeptidases du malt	38
2. " de la trypsine	38
3. " des protéases microbiennes.....	39
c. Conclusions	40

I.	Introduction	1
II.	Revue bibliographique	3
A.	Composés azotés	3
1.	Classification générale	4
2.	Les acides nucléiques	5
3.	Les protéines et leurs produits de dégradation	7
4.	Les produits de l'urée	8
5.	Extraction	9
6.	Purification	9
7.	Fractionnement	11
8.	Caractérisation	13
9.	Les liaisons peptidiques	14
10.	Les acides aminés	15
11.	Les oxydes	19
12.	Les endoprotéines	20
13.	Les endoprotéases	22
14.	Les endoprotéases à groupe sérine	23
15.	Les endoprotéases à groupe sérine	24
16.	Les endoprotéases à groupe sérine	25
17.	Les endoprotéases à groupe sérine	26
18.	Les endoprotéases à groupe sérine	28
19.	Les endoprotéases à groupe sérine	29
20.	Les endoprotéases à groupe sérine	31
21.	Les endoprotéases à groupe sérine	32
22.	Les endoprotéases à groupe sérine	33
23.	Les endoprotéases à groupe sérine	34
24.	Les endoprotéases à groupe sérine	35
25.	Les endoprotéases à groupe sérine	36
26.	Les endoprotéases à groupe sérine	37
27.	Les endoprotéases à groupe sérine	38
28.	Les endoprotéases à groupe sérine	39
29.	Les endoprotéases à groupe sérine	40
30.	Les endoprotéases à groupe sérine	41
31.	Les endoprotéases à groupe sérine	42
32.	Les endoprotéases à groupe sérine	43
33.	Les endoprotéases à groupe sérine	44
34.	Les endoprotéases à groupe sérine	45
35.	Les endoprotéases à groupe sérine	46
36.	Les endoprotéases à groupe sérine	47
37.	Les endoprotéases à groupe sérine	48
38.	Les endoprotéases à groupe sérine	49
39.	Les endoprotéases à groupe sérine	50
40.	Les endoprotéases à groupe sérine	51
41.	Les endoprotéases à groupe sérine	52
42.	Les endoprotéases à groupe sérine	53
43.	Les endoprotéases à groupe sérine	54
44.	Les endoprotéases à groupe sérine	55
45.	Les endoprotéases à groupe sérine	56
46.	Les endoprotéases à groupe sérine	57
47.	Les endoprotéases à groupe sérine	58
48.	Les endoprotéases à groupe sérine	59
49.	Les endoprotéases à groupe sérine	60
50.	Les endoprotéases à groupe sérine	61
51.	Les endoprotéases à groupe sérine	62
52.	Les endoprotéases à groupe sérine	63
53.	Les endoprotéases à groupe sérine	64
54.	Les endoprotéases à groupe sérine	65
55.	Les endoprotéases à groupe sérine	66
56.	Les endoprotéases à groupe sérine	67
57.	Les endoprotéases à groupe sérine	68
58.	Les endoprotéases à groupe sérine	69
59.	Les endoprotéases à groupe sérine	70
60.	Les endoprotéases à groupe sérine	71
61.	Les endoprotéases à groupe sérine	72
62.	Les endoprotéases à groupe sérine	73
63.	Les endoprotéases à groupe sérine	74
64.	Les endoprotéases à groupe sérine	75
65.	Les endoprotéases à groupe sérine	76
66.	Les endoprotéases à groupe sérine	77
67.	Les endoprotéases à groupe sérine	78
68.	Les endoprotéases à groupe sérine	79
69.	Les endoprotéases à groupe sérine	80
70.	Les endoprotéases à groupe sérine	81
71.	Les endoprotéases à groupe sérine	82
72.	Les endoprotéases à groupe sérine	83
73.	Les endoprotéases à groupe sérine	84
74.	Les endoprotéases à groupe sérine	85
75.	Les endoprotéases à groupe sérine	86
76.	Les endoprotéases à groupe sérine	87
77.	Les endoprotéases à groupe sérine	88
78.	Les endoprotéases à groupe sérine	89
79.	Les endoprotéases à groupe sérine	90
80.	Les endoprotéases à groupe sérine	91
81.	Les endoprotéases à groupe sérine	92
82.	Les endoprotéases à groupe sérine	93
83.	Les endoprotéases à groupe sérine	94
84.	Les endoprotéases à groupe sérine	95
85.	Les endoprotéases à groupe sérine	96
86.	Les endoprotéases à groupe sérine	97
87.	Les endoprotéases à groupe sérine	98
88.	Les endoprotéases à groupe sérine	99
89.	Les endoprotéases à groupe sérine	100
90.	Les endoprotéases à groupe sérine	101
91.	Les endoprotéases à groupe sérine	102
92.	Les endoprotéases à groupe sérine	103
93.	Les endoprotéases à groupe sérine	104
94.	Les endoprotéases à groupe sérine	105
95.	Les endoprotéases à groupe sérine	106
96.	Les endoprotéases à groupe sérine	107
97.	Les endoprotéases à groupe sérine	108
98.	Les endoprotéases à groupe sérine	109
99.	Les endoprotéases à groupe sérine	110
100.	Les endoprotéases à groupe sérine	111

Digitized by the Internet Archive
in 2026

III. Objet du travail	41
IV. Materiel et techniques	42
A. Matières premières	42
1. Orge	42
2. Malt	42
3. Enzymes	44
4. Moût de malt	44
5. Moût d'orge	45
6. Bières de malt et bières d'orge	48
B. Appareils analytiques utilisés	49
C. Methodes utilisées	50
1. Dosage de l'azote par semi-micro-Kjeldahl	50
2. " " " α -aminé par la ninhydrine	51
3. " " " " " le TNBS	54
4. Hydrolyse des peptides et des protéines	56
5. Fractionnement sur Amberlite IR 120	57
6. Chromatographie sur Séphadex G25	59
7. " des acides aminés et des peptides..	60
8. Ultrafiltration des nucléotides	63
9. Chromatographie " " 	64
10. Dosage du ribose	65
V. Résultats expérimentaux	68
A. Etude comparative de l'azote peptidique des moûts et bières d'orge et de malt	68
1. Profil de l'azote peptidique	68
a. Etablissement de la méthode de fractionnement.	68
b. Azote total	71
c. Azote α -aminé	77
d. Degré de complexité	83
2. Analyse des résultats	89
a. Fraction I	89
b. " IA	92
c. " IA1	93
d. " IA2	94
e. " IB	95
f. " IB1	96
g. " IB2	99
h. " IB3	101
i. " IB4	102
3. Conclusions	104
B. Recherche d'une protéase idoine à remplacer le maltage	111

C.	Composition en nucléotides des bières de malt et d'orge	114
1.	Etablissement d'une méthode de travail	114
a.	Purification	114
b.	Séparation des nucléotides et dosage	115
2.	Analyse des résultats et conclusions	116
VI.	Discussion générale	119
VII.	Resumé	123
VIII.	Bibliographie	124
VIIII.	Liste des abréviations	131

=====

I. INTRODUCTION

=====

Les progrès considérables de la biochimie appliquée ont entraîné cette dernière décade des transformations révolutionnaires dans les techniques alimentaires (1), la technologie brassicole, discipline biochimique par excellence n' échappe pas à cette tendance et connaît des bouleversements profonds à tous les niveaux du processus de fabrication (2,3), les quelques exemples suivants sont révélateurs de l'évolution qui modifie notre industrie traditionnelle : l'emploi de gibbérélines ou d'hormones similaires, d'inhibiteurs de croissance et d'orges perlées à la malterie, d'extraits de houblon et d'orges non maltées au brassage, la fermentation continue ou pour le moins un raccourcissement important des temps de fermentation et de garde, l'emploi d'extraits de houblon isomérisés dans la bière finie.

La production industrielle d'enzymes (4-12) d'origines bactérienne, fongique, levurienne et végétale fit que le brassage d'orges non maltées à raison de 25 à 50% du versement a dépassé le stade du laboratoire et de la brasserie expérimentale et est utilisé industriellement, la tendance actuelle étant de travailler avec seulement 10% de malt et même à le supprimer entièrement (13-37) ce qui permettrait l'exploit étonnant d'éliminer le maltage en le remplaçant par le brassage d'orges auxquelles on ajoute les enzymes idoines ou par une installation indépendante de la salle de brassage produisant un sirop d'orge.

Si du point de vue industriel, l'aspect économique est non négligeable, la malterie étant un outil coûteux tant en capital investi qu'en frais de production, main d'oeuvre, freinte et énergie, l'avantage technologique le seul qui nous intéresse dans cette étude lui est

supérieur. En effet (37) le brasseur qui utilise du malt est tributaire de l'état enzymatique tel qu'il est à sa disposition, il ne peut jouer que sur les paramètres suivants : grosseur de la mouture, température, pH et durée de la mouture, le brasseur qui utilisera de l'orge plus des enzymes augmentera les degrés de liberté de sa méthode en s'adjoignant la possibilité de jouer sur les enzymes et qualitativement et quantitativement et qui plus est, l'ajoute de ces enzymes ne devra plus nécessairement coïncider avec le début de l'opération mais sera susceptible d'être effectuée à un stade ultérieur du programme, ainsi la composition du moût sera maîtrisée, les pourcentages de ses différents composés (carbohydrates, composés azotés, etc..) pourront être fixés à priori ce qui n'existe pas si, cas fréquent, le malt ne répond pas aux critères voulus. Il s'ensuit que la variété, les conditions écologiques, sol, culture, climat, perdront toute importance qualitative, une orge fourragère sera ipso facto une orge brassicole.

Cette vue idéale mais non utopique dans l'état des connaissances actuelles, pose certains problèmes dont la solution n'est que partielle, ce sont la dégradation des β -glucanes, facteur essentiel pour la filtration, l'obtention de sucres fermentescibles en quantité suffisante pour atteindre l'atténuation limite désirée et une balance équilibrée des composés azotés, ce dernier problème étant l'objet de notre étude.

II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

=====

A. COMPOSES AZOTES

=====

Comparées aux carbohydrates, les substances azotées de l'orge, du malt, du moût et de la bière sont quantitativement moins importantes, cependant leur influence qualitative est loin d'être négligeable, en effet ces substances azotées jouent un rôle primordial sur la nutrition de la levure, la mousse, la stabilité colloïdale et les propriétés organoleptiques, bouche et arôme de la bière, de plus tout le processus enzymatique est réglé par elles, chaque enzyme étant une protéine.

Ces composés azotés sont malheureusement pour leur étude, très différenciés allant du simple acide aminé à la protéine atteignant un poids moléculaire de plusieurs centaines de mille.

1. CLASSIFICATION GENERALE

Les composés azotés de l'orge et du malt peuvent être divisés en quatre classes, les protéines et leurs produits de dégradation, peptides et aminoacides, les acides nucléiques et leurs produits de dégradation, nucléotides, nucléosides et bases puriques et pyrimidiques, les amines avec l'ammoniac et enfin les vitamines.

Nous nous sommes consacrés spécialement dans cette étude aux deux premières classes, les protéines, les acides nucléiques et leurs dérivés, les plus importants tant au point de vue quantitatif, plus de 99% de l'azote total, qu'au point de vue qualitatif.

Les vitamines (38-41) qui ont été décelées sont les suivantes : la biotine (ca. 0,05 p.p.m.), l'acide folique (ca. 0,5 p.p.m.), l'acide nicotinique (ca. 50 p.p.m.), l'acide pantothénique (ca. 3 p.p.m.), la pyridoxine (ca. 5 p.p.m.), la riboflavine (ca. 2 p.p.m.) et l'aneurine (ca. 2 p.p.m.), citons aussi une autre vitamine bien que non azotée, l'inositol (ca. 250 p.p.m.).

Les amines (42-46) peuvent être divisées en deux classes, les amines volatiles, dont une vingtaine de composés ont été trouvés, ne dépasseraient pas 1 p.p.m. dans l'orge et le malt et 0,002 p.p.m. dans la bière, et les amines non volatiles en concentration plus importante dont les principaux constituants présents dans l'orge et le malt sont l'hordénine (ca. 10 p.p.m.), la choline (ca. 10 p.p.m.) et la tyramine (traces). Le taux d'ammoniac faible dans l'orge (ca. 20 p.p.m.) augmente fortement dans le malt (ca. 100 p.p.m.).

2. LES ACIDES NUCLEIQUES

Les acides nucléiques comme les protéines sont des macromolécules dont le poids moléculaire peut atteindre 10^9 , ils présentent un caractère fortement acide et pour cette raison sont souvent associés à des protéines basiques, des amines et des cations, principalement le magnésium. Les chaînons monomériques sont unis par des liaisons esters entre l'acide phosphorique et un sucre, le sucre est le D-ribose dans le groupe des acides ribonucléiques (ARN) et le D-2-déoxyribose dans le groupe des acides déoxyribonucléiques (ADN). Ces pentoses sont sous la forme furanosique et sont liés au phosphate par les groupes hydroxyles C3' et C5'. Au C1' de chaque ribose est attachée par une liaison β une base hétérocyclique du type pyrimidique : cytosine (C), uracil (U), Thymine (T), ou du type purique : adénine (A), guanine (G), inosine (I)

Une unité sucre-base est appelée nucléoside, une unité acide phosphorique-sucre-base un nucléotide.

Les acides nucléiques de l'orge et du malt (47-53) ne se trouvent pas dans la bière, en effet les conditions d'extraction dans le moût sont défavorables, pH trop bas et force ionique insuffisante, le peu qui se dissout est transformé en nucléotides par les ribonucléases ou thermolabile est précipité à l'ébullition. Les nucléotides et nucléosides représentent une part assez importante de l'azote total du moût (5 à 7%), ils sont à peu près inexistantes dans l'orge mais par transformation enzymatique se trouvent en quantité assez importante dans le malt. Les acides nucléiques de l'orge représentent environ 10% de l'azote total.

Les nucléotides du moût sont assimilables par la levure, en fin de fermentation par un jeu de perméabilité de la paroi cellulaire (55) un phénomène inverse se passe et des ribonucléotides sont excrétés dans la bière, ce sont bien des ribonucléotides car ils proviennent de l'ARN protoplasmique, cette excrétion est très marquée pendant la garde. De ce fait les nucléotides présents dans la bière peuvent provenir du moût mais surtout de l'excrétion et dans certaines conditions, de l'autolyse de la levure.

Les nucléotides de par leur type de liaison sont normalement des nucléosides monophosphates 3' ou 5', les nucléotides 5' sont les plus répandus dans la bière (56,57) ils ont des propriétés organoleptiques particulières, ce sont des modificateurs du goût, ils sont responsables, avec les peptides également présents dans le moût et également assimilés et excrétés par la levure, du moëlleux de la bière. On a trouvé que la guanine monophosphate 5' en combinaison avec l'inosine monophosphate 5' avait la propriété à faible concentration d'atténuer l'amertume, l'acidité et de renforcer les goûts sucré et salé (57). Les nucléosides n'auraient pas ces propriétés (58).

3. LES PROTEINES ET LEURS PRODUITS DE DEGRADATION

Les protéines sont des copolymères, il n'y a pas une ligne de démarcation indiquant combien d'unités monomériques sont nécessaires pour faire une protéine. Arbitrairement on considère que le poids moléculaire de 4 à 5.000 est la limite en dessous de laquelle on peut parler de polypeptides (41,59).

Les composés monomériques sont les acides aminés, les 21 aminoacides normalement rencontrés dans les protéines sont présents dans l'orge. Les aminoacides libres sont peu abondants dans l'orge (ca. 2% N total) mais augmentent considérablement dans le malt (ca. 10% N total). Les peptides suivent un chemin parallèle, pondéralement peu abondants dans l'orge (ca. 3% N total), ils représentent environ 50% de l'azote soluble du malt (ca. 20% N total). Il s'ensuit donc que la majeure partie de l'azote protéique de l'orge est constituée des protéines tandis que dans le malt, ces protéines ont subi une série d'attaques enzymatiques pendant la germination avec résultat de les dédoubler en éléments plus simples, polypeptides et acides aminés.

a). LES PROTEINES DE L'ORGE

Il est remarquable que le fractionnement des protéines effectué en 1895 par Ostborne (60), albumines, globulines, prolamines et glutélines soit toujours utilisé. Les albumines et les globulines sont sels solubles, mais les premières seules sont hydrosolubles. Les prolamines sont pratiquement insolubles dans ces solvants mais sont solubles dans l'alcool à 70%. Enfin les glutélines insolubles dans les solvants précédents sont solubles dans les acides et les alcalis dilués. L'ordre de grandeur des quatre fractions dans l'orge peut être évalué comme suit :-

Albumines	3 %
Globulines	17 %
Prolamines	40 %
Glutélines	40 %

Les deux premières fractions appelées communément protéines " solubles " en technologie brassicole, constituent un matériel cytoplasmique, les prolamines et glutélines, " insolubles ", constituent les protéines de réserve de l'albumen qui serviront au développement de l'embryon et plus tard de la plantule. Cette classification selon Ostborne quelle que soit sa commodité ne peut cependant nous faire oublier la complexité de ces fractions protéiques qui en effet sont des mélanges hétérogènes contenant plusieurs espèces macromoléculaires différentes, lesquelles purent être fractionnées grâce aux techniques récentes telles que la chromatographie, l'électrophorèse,

Aujourd'hui, une étude biochimique complète devrait nécessairement comporter quatre étapes, pas obligatoirement successives (1,61) :-

1. l'extraction.
2. la purification : élimination des substances non protéiques.
3. le fractionnement : c'est-à-dire séparation en espèces moléculaires homogènes.
4. la caractérisation.

1. L'EXTRACTION

L'extraction des protéines de l'orge s'est toujours faite après moulture, il est cependant regrettable que par cette technique si simple, on mélange toute une série de substances qui dans l'organisation cellulaire du grain sont séparées.

Des techniques plus sophistiquées telles que l'attaque ultrasonique suivie de centrifugation dans un gradient de densité, pourraient être utilisées avec succès (62), ce qui faciliterait la purification et le fractionnement ultérieurs.

2. LA PURIFICATION

Par suite d'abord de la sélectivité limitée des solvants employés, par suite d'interactions entre molécules protéiques, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de molécules non protéiques, cations, phosphates, acides nucléiques, lipides, hydrates de carbone, polyphénols, par suite aussi d'entraînements d'ordre purement mécanique ou hydrodynamique lors de la solvatation, les fractions obtenues ne sont pas entièrement pures (1). Il en résulte que les albumines et

globulines contiennent presque toujours une fraction de prolamines, que les extraits alcooliques, à côté des prolamines, contiennent encore des albumines et des globulines et déjà un peu de glutélines, que la dernière fraction, les glutélines, est contaminée par des résidus des trois autres fractions. En outre pour les mêmes raisons, des substances non protéiques souillent ces fractions, les albumines notamment en referment autant que de protéines, les globulines renferment des quantités appréciables de phosphore témoignant de la présence d'acides nucléiques et de lipides complexes, les prolamines constituent la fraction la plus pure bien que pouvant être associées à des polyphénols, les glutélines sont associées à un taux appréciable de lipides.

En ce qui concerne l'orge, la purification des protéines est un travail ardu tant au point de vue quantitatif, 9 à 12% seulement étant des protéines, qu'au point de vue qualitatif, de nombreuses substances non protéiques de l'orge ayant des propriétés réactionnelles. L'acide phytique doit être éliminé car il forme avec les protéines des précipités en-dessous de leur point isoélectrique (63), et à des pH supérieurs, des agrégats solubles (64), l'acide phytique peut être précipité par l'ion Ca^{++} mais dans ce cas entraîne avec lui une albumine (65), il vaut donc mieux l'éliminer par dialyse (66) qui par la même occasion élimine toute une série de substances à faible poids moléculaire, sels, sucres.....

Les polyphénols qui ont des propriétés tannantes sont éliminés en majeure partie par décortication des pailles de l'orge qui ne contiennent pas d'azote, la partie résiduelle étant extraite par l'acétone à 75% à -15°C (67). Les albumines de l'orge peuvent être débarassées des polysaccharides solubles par précipitation avec le cadmium (66).

Pendant tout le procédé de purification et évidemment ceci est valable pour les stades ultérieurs, une série de précautions doivent être observées afin de ne pas altérer les propriétés des protéines qui sont des molécules fragiles. La température doit être maintenue aux environs du point de congélation du solvant utilisé. Le ph doit avoisiner 7 grâce à l'emploi de tampons. La concentration devrait être aussi élevée que possible car beaucoup de protéines ont tendance à se dénaturer dans des solutions diluées. Les métaux lourds et l'oxydation, agents dénaturants, seront éliminés respectivement par des séquestrants tels que l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et des réducteurs tels que le mercaptoéthanol et le dithiothréitol. Il est prudent en outre de travailler sous atmosphère d'azote. D'autres facteurs tels la force ionique ou un milieu acide ou basique doivent être rigoureusement contrôlés. Si la protéine est une enzyme, elle est protégée par son substrat ce qui est toujours le cas dans l'orge, du moins dans les stades initiaux. Enfin il faut éviter toute contamination par microorganisme, donc travailler stérilement à basse température et si possible ajouter des antifermens tels que le thymol, le phénol, l'acide caprylique, le merseptyl et éviter toute activité enzymatique, (59, 66-68) en ajoutant des inhibiteurs.

3. LE FRACTIONNEMENT

Le fractionnement des protéines est plus un art qu'une science, il doit toujours être traité comme un cas d'espèce. Une étude exhaustive des techniques et travaux se rapportant à ce sujet sort du cadre de cette thèse, nous donnerons un relevé synoptique des techniques usuelles et des résultats transcendants.

Par modification de la température les albumines peuvent être précipitées par la chaleur des extraits sels solubles, seules les globulines thermostables restent en solution (69), par dialyse des extraits sels solubles, on obtient l'inverse, les globulines précipitent, les albumines hydrosolubles restent en solution (70). Par modification de la composition ou de la force ionique, les globulines peuvent être séparées en diverses fractions en jouant sur la concentration du sulfate ammonique (68,71-73). Par modification des solvants on a pu isoler les prolamines (74-76). Par modification du pH, les glutélines ont pu être solubilisées à pH élevé et reprécipitées à pH neutre (75,77). Par modification de la solubilité, la β -amylase a pu être cristallisée (78,79).

Enfin les techniques modernes ont fait faire un bon en avant à l'étude des fractions polydispersées protéiques, l'ultracentrifugation a permis de diviser les globulines en quatre fractions, les α , β , γ , δ globulines (71), l'électrophorèse (68,70,80-85), l'électrophorèse combinée à des techniques immunologiques (70,86-89), l'électrofocalisation (90,91), les techniques chromatographiques particulièrement par échange d'ions (70,92,93) et par tamis moléculaire (70,94) ont permis de séparer une trentaine de protéines de la fraction sels soluble, sept prolamines et au moins trois glutélines. Il est fort probable que d'autres composés seront découverts dans des recherches ultérieures, rien que le nombre d'enzymes présents dans l'orge doit être plus élevé, en effet presque toutes les protéines qui ont pu être décelées par ces méthodes n'ont pas encore été testées quant à leur pureté. On ne peut se limiter à un seul critère mais différents tests doivent confirmer l'homogénéité d'une protéine isolée tels que la solubilité à force ionique, température, pH et volume de solution constants, l'ultracentrifugation à différents pH et différentes forces ioniques, la détermination du poids moléculaire par des techniques

indépendantes telles que la pression osmotique et la diffusion de la lumière, des séquences analytiques ramenées en moles de protéines, la détection d'impuretés par test enzymatique, l'homogénéité de chromatographie sur différents supports et au moyen de différents solvants, de même il faut vérifier si la protéine isolée est la protéine native ou une de ses sous-unités.

4. LA CARACTERISATION

La finalité d'un fractionnement approprié à la caractérisation des protéines est double, d'une part la protéine isolée doit être pure, d'autre part le rendement en matériau doit être suffisant. La majorité de la somme considérable des travaux qui ont été consacrés au fractionnement des protéines de l'orge présente un caractère analytique, peu nombreuses sont les techniques préparatives qui ont pu fournir en suffisance une protéine pouvant être caractérisée telle la β -globuline ou la β -amylase. C'est pourquoi la caractérisation des protéines de l'orge est à l'état embryonnaire et connaît un sérieux retard sur les protéines animales (61).

Structure primaire Seuls sont connus les aminoacides totaux des fractions hétérogènes (84,95), les groupes terminaux carboxyliques et aminés (96-98) et les poids moléculaires (98). La séquence d'acides d'aucune protéine de l'orge n'a été déterminée pas même celle de la β -globuline qui est la fraction la plus pure que l'on ait obtenue (73).

Structures secondaire, tertiaire et quaternaire : A fortiori rien n'est connu de ces structures, la seule exception est la formation d'agrégats de la β -globuline (73).

b). L' AZOTE SOLUBLE DU MALT

L'azote soluble du malt est constitué par les protéines solubles et les produits de dégradation des protéines de l'orge, peptides et aminoacides, par des nucléotides, des nucléosides et leurs bases.

Le rapport entre azote soluble et azote total, appelé indice Kolbach, peut varier de 30 à 50%.

Afin d'obtenir une idée de la complexité des différents constituants de l'azote soluble, une série de méthodes plus ou moins empiriques basées sur fractionnement par précipitation ont été établies : précipitation par la chaleur qui donne l'azote coagulable (99), précipitations par l'acide tannique et ensuite par l'acide molybdique, qui donnent les fractions de Lundin (100), précipitations par le sulfate de magnésium et l'acétate d'uranyle (101), précipitation par l'acide trichloroacétique (102,103), précipitations par le sulfate ammonique à différentes concentrations (104-106). Ces méthodes peu spécifiques combinées avec la détermination de l'azote formol (107), la détermination de l'azote alpha-aminé par la ninhydrine ou l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) (108-110), la séparation des azotes adialysable et dialysable (111), l'azote fermentescible (112) et l'absorption sur charbon actif (99) ont donné des renseignements utiles sur le brassage et dans le cas de notre étude ont démontré que la dissolution des matières azotées au maltage est un des phénomènes le plus important qui s'y passe, parce que leur dédoublement est aussi grand pendant la germination qu'au brassage, ces matières dédoublées au maltage sont moins complexes que celles dissoutes au brassage. Les résultats obtenus par ces méthodes peu spécifiques fournissaient des valeurs globales qui pouvaient certes donner des informations par comparaison mais finalement disaient peu, ces valeurs étaient

arbitraires et subjectives.

En effet jusque récemment la séparation de peptides en mélange avec un grand excès d'acides aminés, a présenté des difficultés, en conséquence peu était connu sur les peptides du moût (113) jusqu'à ce qu'une méthode de complexion par le cuivre suivie par chromatographie sur diéthylaminoéthyl (DEAE) cellulose (114) ait permis une séparation plus aisée des acides aminés, des peptides et polypeptides du malt, du moût et de la bière (115-118).

Si la fraction peptidique de l'azote soluble du malt est mal connue, par contre les acides aminés libres de l'orge, du malt, du moût et de la bière ont été étudiés en détails. Dans l'orge très peu d'acides aminés se trouvent à l'état libre, 1 à 3% seulement de l'azote total, le malt par contre en contient davantage, environ 10% de l'azote total ce qui représente 20 à 35% de l'azote soluble du malt ou de l'azote total du moût. En augmentant le degré de trempage de l'orge, on augmente la production d'acides aminés à l'exception de la proline et de la méthionine qui diminuent (119). L'évolution de chaque acide aminé a été étudiée sous sa forme libre et sous sa forme combinée au cours de la germination, dans l'embryon, dans l'endosperme et dans les radicules (120). Plus froide est la germination, plus élevée est la production d'acides aminés qui cependant après avoir atteint un maximum diminue, à l'exception de la proline dont la concentration continue de s'accroître, le moment où ce maximum est atteint dépend des conditions de maltage, entre cinq et huit jours (119,121). L'acide gibbérélique comme une germination froide, augmente la production d'acides aminés, par contre le bromate la diminue. Pendant le touraillage, il y a une légère diminution des acides aminés par formation de mélanoidines, la température du coup de feu, 80 ou 85°C, joue un rôle moins important que sa durée (119). Pris dans leur ensemble, les acides aminés augmentent d'environ cinq fois pendant le maltage, pris individuellement de une à dix fois, si ce n'est

la proline qui augmente d'environ trente cinq fois (120).

Au cours du brassage tous les acides aminés ne sont pas libérés à la même vitesse (122), car ils ne proviennent pas uniquement d'une dissolution des aminoacides libres préformés dans le malt mais sont partiellement produits par protéolyse (19,123). Pendant l'ébullition du moût il y a peu de changement si ce n'est une légère augmentation de la valine et de la thréonine, lesquelles proviendraient du houblon (122).

Si l'on brasse de l'orge avec des protéases microbiennes on peut jouer sur le temps et sur la concentration d'enzymes pour obtenir une plus forte proportion d'acides aminés par rapport à l'azote solubilisé (27,37).

Au cours de la fermentation les aminoacides suivent un ordre déterminé pour leur assimilation par la levure, cet ordre est influencé par les différents facteurs qui régissent la fermentation : la levure utilisée, basse ou haute, floculente ou poussiéreuse, l'effet mécanique causé par l'agitation, le CO_2 ou les flocons de soja, la température, la vitesse de fermentation, l'atténuation limite, la composition et la richesse en aminoacides (121,124-129). Dans des conditions standardisées, les aminoacides peuvent être divisés en quatre classes selon leur vitesse d'absorption et leur degré d'utilisation, si un ou plusieurs facteurs repris ci-dessus varient, certains changements peuvent apparaître dans les classes ou dans le degré d'utilisation, il est même possible d'obtenir des conditions dans lesquelles finalement tous les aminoacides sont absorbés à l'exception de la proline. Nous donnerons la classification type d'une bière basse (127) :

Groupe A : l'asparagine, la glutamine, la sérine et la thréonine dont l'absorption est pratiquement linéaire et dont l'assimilation est complète au début de la phase logarithmique de croissance.

Groupe B : la méthionine, la lysine, l'acide aspartique, la leucine, l'acide glutamique, l'isoleucine, l'ammoniac, l'arginine dont l'absorption commence après une certaine phase de latence et dont l'assimilation est plus ou moins complète.

Groupe C : l'histidine, la valine, la phénylalanine, l'alanine, la glycine, la tyrosine, le tryptophane dont l'absorption est plus lente et qui ne sont jamais assimilés complètement.

Groupe D : qui contient seulement la proline qui peut se retrouver intacte après la fermentation et dont l'assimilation ne dépasse jamais plus de vingt cinq pour cent. Encore une fois la proline fait exception, son utilisation complète ne peut être obtenue que dans les conditions artificielles où de l'oxygène serait présent jusque la fin de la fermentation (128,130), ce qui n'est pratiquement jamais le cas.

Arbitrairement la quantité minimale d'acides aminés nécessaires à une fermentation normale a été fixée à 20 mg. d'azote alpha-aminé par degré Plato et par litre de moût (27), cependant la croissance de la levure est d'autant meilleure que la concentration en amino-acides est élevée et ceci s'applique particulièrement si la levure est floculente (128), de même le pouvoir fermentaire est d'autant plus stable (131).

B. LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

=====

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases capables de scinder les liaisons amides ou peptidiques des protéines. On distingue deux catégories : les enzymes capables de scinder les chaînes peptidiques à l'intérieur des protéines, ce sont les endopeptidases (ou protéases) et les enzymes capables de couper seulement les liaisons terminales des protéines ou des peptides, ce sont les exopeptidases (ou peptidases).

1. LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES DE L'ORGE ET DU MALT

Les enzymes protéolytiques de l'orge et du malt peuvent être divisées en trois classes selon leur solubilité, solubles dans l'eau, solubles dans une solution saline, insolubles dans ces solvants. Ces trois classes ont des comportements différents vis-à-vis d'activateurs tels le sulfure d'hydrogène ou l'acide thioglycolique, de la température ou de la force ionique, et leur activité se développe à des vitesses différentes au cours du maltage (132,133).

Il convient de remarquer qu'il est possible d'obtenir une extraction complète dans l'eau acidifiée à pH 4,9 des enzymes solubles dans une solution saline et que les enzymes insolubles seraient solubilisées dans ces conditions par ajout de mercaptoéthanol. Cette dernière hypothèse n'a pu être vérifiée car les enzymes ainsi extraites ne sont pas stables et perdent rapidement toute activité (124).

Les enzymes hydrosolubles, donc des albumines, représentent environ soixante pour cent de l'activité protéolytique des enzymes solubles, les enzymes sels solubles, donc des globulines, représentent les quarante pour cent restants. Par fractionnement sur DEAE cellulose, les albumines neutres et acides montrent une activité protéolytique égale tandis que les albumines alcalines ne renferment pas d'enzymes protéolytiques (135).

a). LES ENDOPEPTIDASES

L'étude des endopeptidases est complexe, aussi la progression de nos connaissances sur ce sujet est très lente et des résultats intéressants n'ont été obtenus que ces toutes dernières années. Une double difficulté est à surmonter, la première : obtenir une préparation enzymatique homogène, peu d'enzymes protéolytiques de l'orge et du malt ont été obtenus à l'état pur ; la seconde : obtenir un substrat naturel pur et reproductible dont la structure chimique serait connue, ceci n'est généralement pas le cas et c'est pourquoi on s'est servi de substrats artificiels telles la caséine, l'hémoglobine, la gélatine ou de produits de synthèse, tels le benzoyl-arginine-p-nitronilide (BAPA) (136), le benzoyl-arginine-éthylester (BAEE) (137), il n'est malheureusement pas sûr que les conditions dans l'orge ou le malt soient les mêmes qu'avec ces substrats de remplacement (138). Si on utilise comme substrat l'hémoglobine (139) ou la caséine (140), les endopeptidases aussi bien que les exopeptidases sont mesurées par contre si la gélatine (141) est employée, l'activité enzymatique mesurée par la diminution de la viscosité est très peu affectée par la coupure d'acides aminés terminaux mais bien si la chaîne peptidique est scindée en son centre, il se fait donc que les seules endopeptidases influencent le résultat.

Toutes les endopeptidases connues peuvent être classifiées selon leur comportement vis-à-vis des trois inhibiteurs suivants : le diisopropylfluorophosphate (DFP), l'acide p-chloromercuribenzoïque (PCMB), l'éthylènediaminetétracétique (EDTA) (134,142) :

- a) les enzymes à centre actif sérine inactivées par le DFP (telles la trypsine, la chymotrypsine, la subtilisine).

- b) les enzymes à centre actif sulfhydryl inactivées par le FCMB (telles la papaïne, la ficine, la broméline, les cathepsines B et C).
- c) les enzymes à centre actif métallique inactivées par l' EDTA (telles certaines cathepsines et de nombreuses protéases bactériennes ou fungiques).
- d) les enzymes insensibles à ces trois inhibiteurs (telle la pepsine) appelées aussi acidoenzymes.

1. ENDOPEPTIDASES A GROUPE ACTIF SERINE

Ces enzymes coupent la chaîne peptidique au niveau du carboxyl d'un chaînon arginine ou lysine. Le DFP inactive ces enzymes par action sur le groupe hydroxyl de la sérine avec libération d'acide fluorhydrique.

Certains auteurs (143,144) ont isolé trois endopeptidases qui seraient de ce type, ils les appellent les peptides hydrolases A, B, et C, elles sont totalement inhibées par le DFP.

La peptide hydrolase A, active sur le BAPA, substrat typique pour tester l'activité de la trypsine, a comme cette dernière, un maximum d'activité à pH 8,6 (135,145). En plus du DFP, la peptide hydrolase A est inhibée plus ou moins par les inhibiteurs spécifiques des thio- ou des métalloenzymes. Ceci proviendrait de ce que l'enzyme en plus d'un ou plusieurs groupes actifs sérine et d'un cation sur ce centre actif, posséderait un ou plusieurs groupes sulfhydryls proches de ce centre actif.

La peptide hydrolase B qui a un maximum d'activité à pH 7 est spécifiquement active sur le substrat de synthèse BAEE, elle est totalement inhibée par le DFP, elle est peu sensible aux inhibiteurs des thioenzymes et pas du tout à ceux des métalloenzymes.

La peptide hydrolase C, spécifique du substrat de synthèse l'acétate d' α -naphtyl, est totalement inhibée par le DFP mais est complètement insensible aux inhibiteurs des thio- et des métalloenzymes.

Selon d'autres auteurs (134,146,147), la peptide hydrolase A (nommée aussi bapase vu son substrat spécifique) serait une thioenzyme et ne serait pas du tout inhibée par le DFP, de même pour la peptide

hydrolase C. Quant à la peptide hydrolase B, elle serait effectivement inhibée par le DFP mais serait classée à tort comme endopeptidase, ce serait une carboxypeptidase spécifique du carbobenzoxy-phénylalanine-alanine mais qui attaquerait également le BAEE, jusqu'alors considéré comme substrat spécifique des endopeptidases.

En ce qui concerne l'orge et le malt, nous pensons que quelle que soit l'hypothèse correcte, ces trois peptide hydrolases ne peuvent jouer un grand rôle car elles sont actives aux ph alcalins alors que la maische est de 5,5-6,0.

Ceci d'ailleurs serait peut-être la cause de ces conclusions divergentes.

2. ENDOPEPTIDASES A GROUPE ACTIF THIOL

C'est le groupe le plus important de l'orge et du malt, soixante dix pour cent de l'activité endopeptidasique de l'orge qui s'élèvent à quatre vingt dix pour cent dans le malt vert ou le malt touraillé (134). Elles sont entièrement inhibées par le PCMB et aux ph inférieurs à 2,5 et supérieurs à 8,0. L'activité maximale se situe à ph 3,9 et résulte de l'action combinée d'au moins deux enzymes, une partie ayant un maximum d'activité au ph normal du brassin, c'est-à-dire entre ph 5,5-6,0.

3. ENDOPEPTIDASES A GROUPE ACTIF METALLIQUE

C'est la première fois que des métalloenzymes ont été isolées dans des plantes (134), l'activité endopeptidasique de trente pour cent dans l'orge diminue au cours du maltage pour atteindre dix pour cent

dans le malt vert ou le malt touraillé. Ces enzymes sont actives entre ph 4 et ph 10, avec une activité maximale à ph 6,9 résultant de l'action combinée d'au moins deux enzymes dont les maxima d'activité se situent à ph 5,5 et 8,5.

4. ENDOPEPTIDASES DU TYPE PEPSINE

Ces enzymes n'existeraient ni dans l'orge, ni dans le malt (134).

b). LES EXOPEPTIDASES

Les exopeptidases agissent sur des liaisons peptidiques adjacentes à des groupes libres aminés ou carboxyliques. Si leur isolation à l'état pur présente les mêmes difficultés que pour les endopeptidases, il n'en est pas de même pour leurs substrats spécifiques beaucoup plus simples, lesquels peuvent être synthétisés, c'est pourquoi ces enzymes sont mieux connus. On les divise en plusieurs groupes :-

- a). les carboxypeptidases : qui pour agir requièrent la présence d'un groupe libre carboxylique terminal et scindent la liaison peptidique adjacente à ce groupe.
- b). les aminopeptidases : même mécanisme que pour les carboxypeptidases mais requièrent la présence d'un groupe terminal aminé.
- c). les di- ou tripeptidases : n'agissent spécifiquement que sur des peptides simples : di- et tripeptides et non sur des chaînes similaires plus longues.

1. LES CARBOXYPEPTIDASES

Les carboxypeptidases sont les enzymes les plus importantes du malt quant à la production d'acides aminés au brassage. En effet leur pH optimum d'action est compris entre pH 4,0 et 6,0 ce qui correspond au pH 5,5-6,0 du brassin. Ce sont les plus thermostables et comme elles sont spécifiquement inhibées par le DFP, il a pu être démontré qu'elles sont responsables pour plus de soixante quinze pour cent de la production des aminoacides (147,148). Trois carboxypeptidases ont été décelées et toutes trois en assez faible concentration dans l'orge augmentent fortement durant la germination, de dix à vingt fois. Le touraillage a peu d'action sur ces enzymes (149).

Les carboxypeptidases ont été classées selon leur affinité optimale pour différents carbobenzoxydipeptides spécifiques bien qu'elles puissent agir, il est vrai à des vitesses moindres, sur d'autres carbobenzoxypeptides. Elles libèrent des aminoacides terminaux carboxyliques des protéines mais n'ont ni action aminopeptidasique, ni action dipeptidasique.

a). La Z-Phe-Ala carboxypeptidase

La carbobenzoxypénylalaninealanine (Z-Phe-Ala) carboxypeptidase a été isolée à l'état très pur. Son poids moléculaire est de l'ordre de 90.000, sa préparation purifiée était homogène à l'ultracentrifugation et présentait quelques impuretés en traces seulement à forte concentration à l'électrophorèse sur disque.

Son action hydrolysante pour la Z-Phe-Ala est très grande mais elle agit sur d'autres substrats à des vitesses moindres, quatre à dix pour cent seulement, particulièrement sur la Z-Glu-Tyr et les trois Z-dipeptides à groupe pénultième Phénylalanine : Z-Phe-Phe, Z-Phe-Gly, Z-Phe-Ser. Cette enzyme hydrolyse également l'ester Benzoyl-arginine d'éthyl lequel avait toujours été considéré comme un substrat typique des endopeptidases.

Le ph optimum de l'action enzymatique est de 5,2 , la température optimale de 45°C mais cette enzyme présente encore une activité de quinze pour cent après une heure à 70°C. Faible dans l'orge, elle augmente de vingt fois dans le malt (147-150).

b). La Z-Phe-Phe carboxypeptidase

Cette carboxypeptidase a été également purifiée, elle présente une affinité pour le substrat Z-Phe-Phe et hydrolyse l'hippurylphénylalanine (ou benzoylglycinephénylalanine).

C'est la plus thermostable des carboxypeptidases du malt, elle présente encore quarante pour cent de son activité après une heure à 70°C mais atteint son maximum d'activité à 55°C. Le ph optimum est de 5,7. Faible dans l'orge, elle augmente quinze fois dans le malt (147-149, 151).

c). La Z-Pro-Try carboxypeptidase

Cette enzyme n'a pas encore été purifiée, elle est plutôt thermolabile, son maximum d'activité se situe à 45°C et elle est directement détruite à 70°C, son ph optimum est de 4,8. Très faible dans l'orge, elle augmente de dix fois dans le malt (147-149).

2. LES AMINOPEPTIDASES

On a observé la présence de trois de ces enzymes dans l'orge et le malt; elles hydrolysent les β -naphtylamides de la plupart des acides aminés mais ce avec différentes spécificités (147,152). Ces enzymes sont présentes dans l'orge à une concentration plus élevée que les carboxypeptidases mais n'augmentent que de deux fois pendant la germination, le touraillage n'a pas d'action sur ces enzymes.

a). La Phe- β -NA aminopeptidase

La phénylalanine- β -naphtylamide aminopeptidase a été purifiée, elle hydrolyse les β -naphtylamides des aminoacides hydrophobiques; parmi lesquels le meilleur substrat est le Phe- β -NA et pour lequel le ph optimum est 7,2. Il est intéressant de remarquer qu'à un ph plus acide compris entre 5,8 et 6,5, elle hydrolyse également des di- et tripeptides et des dipeptidylamides.

Sa température optimale est de 45°C et à 55°C l'enzyme est inactivée. Assez importante dans l'orge, elle n'augmente que de deux fois dans le malt (147-149,152).

b). La Arg- β -NA aminopeptidase

L'arginine- β -naphtylamide est le meilleur substrat de cette enzyme, le ph optimum est de 7,2 , la température optimale de 45°C, elle résiste cependant à 55°C mais est complètement inhibée à 70°C.

Faible dans l'orge, elle augmente de deux fois et demi dans le malt (147-149).

c). La Leu- β -NA aminopeptidase

Cette enzyme est la moins bien connue des trois aminopeptidases, son ph optimum est aussi de 7,2 (147-149).

3. LES PEPTIDASES

Deux di- et tripeptidases du malt ont été décelées dès 1929 (153), elles sont déjà présentes en assez grande quantité dans l'orge et augmentent de trois à six fois durant la germination; le touraillage a peu d'effet sur elles (147-149).

a). L'alanylglycine peptidase

Cette enzyme a son maximum d'activité à 45°C et est totalement inactivée après une heure à 55°C, son ph optimum est de 7,8.

Très active déjà dans l'orge, elle augmente encore trois fois pendant la germination, c'est la plus active des exopeptidases,

cependant son activité dans le brassin est très limitée vu le faible ph de celui-ci (147-149).

b). La leucylleucylglycine peptidase

Cette enzyme originellement classée comme tripeptidase a également une très forte action sur le dipeptide leucyltyrosine.

Son ph optimal 8,6 est encore plus éloigné du ph du brassin, son activité est maximale à 45°C, elle est seulement inactivée à 70°C. Présente dans l'orge, elle augmente de six fois pendant la germination.

2. LES PROTEASES INDUSTRIELLES

Les progrès de la microbiologie et de la biochimie ont permis l'utilisation industrielle courante des enzymes en de nombreux domaines aussi diversifiés que les industries alimentaires humaine et animale, les textiles, la tannerie, la mégisserie, les détergents, la pharmacie, les laboratoires d'analyse ou de recherche, la papeterie. De nombreux types d'enzymes ont pu être produits industriellement : des amylases (dès 1906), des protéases (dès 1911), des cellulases, des pectinases, des lipases, des amyloglucosidases et chaque jour voit surgir de nouvelles applications. Les protéases industrielles sont de deux types, les protéases microbiennes, les protéases végétales.

a). LES PROTEASES MICROBIENNES

Les protéases utilisées en brasserie comme en toute industrie alimentaire doivent répondre à certains critères hygiéniques, techniques, commerciaux et légaux (11) qui sortent du cadre de cette étude. De ce fait, le nombre d'organismes producteurs de protéases qui sont commercialisées, est sérieusement restreint et limité aux trois organismes suivants : le bacillus subtilis, les aspergillus niger et orizae (6,7,11,12). Normalement, ces protéases utilisées pour la digestion de l'orge ne sont pas des préparations pures, mais sont le résultat d'une action secondaire, l'action principale étant une action amylolytique.

Ces protéases microbiennes sont classées en trois groupes principaux : les protéases acides, les métalloprotéases neutres et les protéases alcalines à groupe sérine.

1. LES PROTEASES ACIDES

Ces enzymes sont principalement d'origine fungique (aspergillus) et ont des propriétés similaires à celles des enzymes animales, la pepsine et la rennine, elles sont insensibles aux réactifs des groupes sulfhydryliques, aux agents chélatants, aux métaux lourds, au DFP. Elles sont stables aux ph compris entre 2,0 et 5,0 et leur activité optimale se passe à ph trop bas pour être utilisées au ph 5,5 du brassage (11,154,155).

2. LES METALLOPROTEASES NEUTRES

Ces enzymes ont un poids moléculaire compris entre 35-45.000 et sont principalement d'origine bactérienne, *Bacillus subtilis*, *B. mégatérium*, *B. céréus*, *Pseudomonase aéru ginosa*, *Streptomyses griséus* et *Aéromonase protéolytica* auxquels nous devons ajouter le *Bacillus thermoprotéolyticus* dont la protéase, la thermolysine résiste une heure à 80°C avec seulement une perte de cinquante pour cent de son activité alors que les autres enzymes sont inactivées après quinze minutes à 60°C, leur température d'activité maximale étant de 45-50°C. Toutes ces protéases ont un ph optimum aux alentours de 7,0 mais sont très actives au ph 5,5 du brassin.

Elles sont sensibles aux agents chélatants comme l' EDTA mais insensibles au DFP et aux réactifs des thiols. Le métal de l'enzyme est le Zn, si ce Zn est éliminé par dialyse avec des solutions d'agents chélatants, un apoenzyme inactif est obtenu, lequel peut être réactivé par le Zn ou certains autres métaux bivalents (11,156,157).

3. LES PROTEASES ALCALINES A GROUPE SERINE

Les enzymes les mieux connues de ce groupe sont les subtilisines (Novo ou Carlsberg) issues de différents *Bacilli subtilis* mais qui ont toutes des propriétés semblables; maximum d'activité étalé dans une zone de ph de 7 à 10, donc pas intéressant pour le brassage, inhibition par le DFP mais ni par les réactifs des thiols, ni par les agents chélatants, maximum d'activité à 45-50°C et inactivation complète à 65°C. (11,156-159)

b). LES PROTEASES VEGETALES

Les protéases utilisées industriellement sont au nombre de quatre : la papaïne et la chimopapaïne toutes deux extraites du papayer, la broméline extraite de l'ananas et la ficine extraite du figuier.

La papaïne est de loin la plus commercialisée et la seule utilisée en brasserie, ce depuis plus d'un demi-siècle.

La papaïne est normalement utilisée dans la bière comme préservatrice de la stabilité colloïdale et ce n'est que ces dernières années que des essais ont été faits pour l'utiliser comme protéase de l'orge en salle de brassage. Généralement on recourt plutôt aux extraits bactériens qui ont une très forte activité amylolytique.

Ces quatre protéases végétales ont des activités voisines et nous donnerons seulement les propriétés de la papaïne, enzyme le mieux connue.

1. LA PAPAÏNE

La papaïne a été complètement purifiée et caractérisée. La composition et la séquence des acides aminés de sa chaîne sont connues, une seule chaîne de 187 aminoacides contenant trois ponts disulfures dont un seul fait partie du centre actif de l'enzyme. Le poids moléculaire à pH 5,7 est de 20.900, mais à pH plus élevé la structure quaternaire se modifie et la papaïne forme des agrégats.

La papaïne a un spectre étendu d'activité, elle hydrolyse toute une série de substrats, des liaisons peptidiques entre une variété

assez large d'acides aminés sont scindées et également des amides, des esters, des thiolesters.

Environ deux tiers des aminoacides de la papaïne ont pu être enlevés par une aminopeptidase sans altération de l'activité enzymatique. Le ph optimum d'action se trouve entre 5,5 et 6,0, mais l'activité reste très marquée entre ph 2 et 8. De même si le maximum d'activité est atteint à 60°C, cette enzyme est thermostable et comparable à la thermolysine.

La papaïne est inhibée par les agents réagissants sur les groupes sulfhydryliques tels l'acide iodoacétique, le bromate, la p-chloro-mercuribenzoate, les métaux lourds; elle est activée par les agents réducteurs comme la cystéine, le glutathione HCN, H₂S et par les agents chélatants comme l' EDTA (37,158-161).

3. LES INHIBITEURS

Les inhibiteurs peuvent être scindés en deux groupes, les inhibiteurs synthétiques et les inhibiteurs naturels.

Les inhibiteurs synthétiques ont rendu d'éminents services dans l'étude des enzymes vu la difficulté d'isoler "in vitro" enzymes et substrats. "In vivo" on pouvait arriver à l'aide d'inhibiteurs spécifiques à obtenir une préparation où une enzyme ou un groupe d'enzymes travaillait ou ne travaillait pas et par différence déterminer l'activité ainsi que nous l'avons vu au chapitre des enzymes protéolytiques.

Les inhibiteurs naturels de l'orge peuvent être divisés en deux catégories, les inhibiteurs à faible poids moléculaire, les inhibiteurs à poids moléculaire élevé.

a). LES INHIBITEURS A FAIBLE POIDS MOLECULAIRE

Ces inhibiteurs peuvent être éliminés par ultra filtration ou par tamisage moléculaire sur séphadex G25, leur poids moléculaire étant inférieur à 4.000. Ces inhibiteurs affectent l'activité de l'endopeptidase, la peptide hydrolase A et sont présents dans le malt. Cette inhibition est peu stable et ce d'autant moins qu'on élève la température et le ph. Stable à ph 5,9 elle diminue de deux fois et demi si l'on porte la température à 25°C et le ph à 8,5 (135,145,163).

b). LES INHIBITEURS A POIDS MOLECULAIRE ELEVE

L'orge contient en outre trois inhibiteurs à poids moléculaire élevé, un inhibiteur des endopeptidases du malt, un inhibiteur de la trypsine et un inhibiteur des endopeptidases microbiennes et de la chimotrypsine.

1. L'INHIBITEUR DES ENDOPEPTIDASES DU MALT

Cet inhibiteur présent en faible quantité dans l'orge disparaît après le second jour de germination. Comme l'inhibition est relativement moins importante que l'activité protéolytique du malt et qu'elle disparaît juste au moment où cette activité protéolytique commence à s'élever, il n'est donc pas évident que les endopeptidases du malt soient déjà présentes dans l'orge en quantité correspondante (134,161, 163).

2. L'INHIBITEUR DE LA TRYPSINE

Cet inhibiteur a été purifié, c'est une protéine thermostable dont le poids moléculaire est 14.400. Il inhibe la trypsine dans la proportion molaire 1:1 et n'affecte pas les enzymes du malt. Très importante dans l'orge, l'inhibition diminue légèrement pendant la germination, est stable pendant le touraillage et le brassage et ne disparaît que progressivement à l'ébullition et complètement après l'ajoute du bicarbonate (134,162,163) seulement.

3. L'INHIBITEUR DES PROTEASES MICROBIENNES

Cet inhibiteur a été également purifié; il inhibe au moins trois protéases microbiennes (la protéase alcaline d'*Aspergillus orizae*, la subtilopeptidase A du *Bacillus subtilis* et au moins une des protéases de *Streptomyces griseus*) et la chimotrypsine.

Cet inhibiteur n'est pas actif sur les protéases neutres microbiennes, sur la trypsine et sur les endopeptidases du malt.

L'inhibition élevée dans l'orge diminue légèrement pendant la germination, moins thermostable que la précédente, l'inhibition diminue encore pendant le touraillage et disparaît complètement pendant le brassage au début de l'ébullition (134,162,163).

c). CONCLUSIONS

1. L'inhibition des enzymes protéolytiques du malt qui subsiste dans le malt résulte uniquement de l'inhibiteur à faible poids moléculaire.

2. La présence des inhibiteurs dans l'orge fait que :
 - a) l'orge est prémunie contre une autolyse protéolytique pendant le stockage.
 - b) l'orge jusqu'au malt est protégée contre des attaques protéolytiques microbiennes.

3. L'utilisation d'orge en salle de brassage diminue :
 - a) faiblement l'activité des endopeptidases du malt, si l'orge et le malt sont ajoutés conjointement.
 - b) fortement l'activité des protéases microbiennes qui seraient éventuellement ajoutées.

III. OBJET DU TRAVAIL

=====

1. Préparer des moûts et des bières à partir de la même orge, d'une part par voie traditionnelle orge - malt - moût - bière, d'autre part par élimination du maltage et son remplacement par solubilisation enzymatique, orge - moût - bière.
2. Etablir par un fractionnement adéquat le profil azoté et comparer entre eux les moûts et bières obtenus au point de vue protéines, peptides, aminoacides et nucléotides.
3. Chercher s'il y a lieu une méthode qui permettrait un profil identique dans les deux cas.

IV. MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES

=====

A. MATIERES PREMIERES

=====

1. ORGE

a) Culture

Orge Beka de la récolte 1970 en provenance de Thessalie Grèce et garantie pure par les Laboratoires du NIBEM Rotterdam Hollande.

Cette orge a été calibrée sur trieur de laboratoire et la qualité supérieure à 2,5 mm. a été utilisée.

b) Caractéristiques

- Humidité	%	12,5
- Azote total sur sec	%	1,88
- Poids de 1.000 grains sur sec	gr.	36,0

2. MALT

a) Maltage

Le malt a été fabriqué à partir de l'orge ci-dessus en malterie expérimentale d'une capacité de 1,2 Kg.

Trempe : L'orge est mise en trempe dans un bain d'eau thermostatisé à $16,0 \pm 0,5$ °C et à travers lequel barbotait de l'air au débit de $0,2 \text{ m}^3/\text{h}$. La trempe a été arrêtée après 44 heures

lorsque le degré de trempage de 45 % avait été obtenu.

Germination : L'orge trempée est transvasée dans un panier à fond perforé à travers lequel est insufflé de l'air saturé d'eau et thermostatisé à $14,0 \pm 0,5$ °C au débit de $5,6 \text{ m}^3/\text{h}$. La germination dure cinq jours.

Touraillage : Le touraillage a lieu dans le même panier. L'air utilisé est sec, son débit est porté à $60 \text{ m}^3/\text{h}$ et il est chauffé selon le schéma suivant :

- 3 heures à 45 °C
- 3 heures à 60 °C
- 2 heures à 75 °C
- 2 heures à 80 °C

Les radicules sont enlevées au tamis.

b) Caractéristiques

- Humidité	%	3,9
- Extrait tel quel	%	77,8
- " sur sec	%	81,0
- Différence fine/grosse mouture	%	1,3
- Azote total sur sec	%	1,84
- " soluble sur sec	%	0,83
- Indice Kolbach		45
- Hartong à 20 °C	%	27,3
- " à 45 °C	%	38,4
- ph		5,70
- Coloration	E.B.C.	4,0
- Temps de saccharification	min.	10

3. ENZYMES

a) Enzymes protéolytiques

1. Protéase neutre industrielle d'origine bactérienne extraite du *Bacillus Subtilis*, fournie par la Société Rapidase, France, sous le nom de Protéase B 500.
2. Protéase industrielle d'origine végétale extraite du papayer, fournie par la Société Merck, Darmstadt, Allemagne, sous le nom de papaïne pure Merck.
3. Douze protéases d'origine bactérienne de la collection du Professeur Masschelein - Céria - Bruxelles et répertoriées P1 à P12.

b) Enzyme amylolytique

Alpha-amylase d'origine bactérienne extraite du *Bacillus Subtilis*, fournie par la Société Rapidase, Seclin, France, sous le nom de superclastase.

4. MOÛT DE MALT

a) Brassage

En brasserie expérimentale, nous avons empâté la mouture du malt ci-dessus avec de l'eau à 50°C dans le rapport 1 à 4, le pH du brassin a été corrigé à pH 5,6 par HCl et la méthode par infusion suivante a été suivie :

50°C : stationnement de 30 min.
50°C à 65°C : montée en 15 min.
65°C : stationnement d'une heure.
65°C à 72°C : montée en 7 min.
72°C : stationnement de 30 min.
72°C à 77°C : montée en 5 min.

filtration et lavages.

Ebullition : le ph au début de l'ébullition a été corrigé à ph 5,3 par Hcl et l'ébullition a été maintenue jusqu'à ce que la densité de 12° Pl. soit obtenue (après 70 min. environ).

b) Caracteristiques

Voir tableau 1 p.47

5. MOÛT D'ORGE

a) Brassage

Nous avons basé notre méthode de brassage sur des travaux précédents (164-166) qui démontrèrent que les meilleurs résultats au point de vue azote solubilisé avaient été obtenus par l'action synergique de deux enzymes industrielles protéolytiques, la protéase B 500 et la papaïne. Conjointement nous avons utilisé une α -amylase pour obtenir une saccharification complète et ultérieurement être capables de fermenter ce moût.

La mouture de l'orge décrite ci-dessus est réalisée en deux étapes, un broyage grossier au moulin à cylindre Miag suivi d'une mouture fine au moulin à marteaux Wiley (tamis de 1,5 mm.)

Dans une cuve de brassage, la farine d'orge ainsi obtenue est empâtée dans le rapport 1 à 5 dans une solution calcique à 55°C (100 mg CaCl_2 + 333 mg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pour 1 l. d'eau) et amenée à pH 6,0. Les sels de calcium sont ajoutés pour stimuler l'activité de la superclastase et le pH 6 est le pH optimum pour l'action combinée des trois enzymes qui sont ajoutées dans les proportions suivantes :

- Protéase B 500	: 0,1%
- Papaïne	: 0,1%
- Superclastase	: 0,1%

On utilise le schéma de brassage suivant :

55°C	: stationnement d'une heure
55°C à 70°C	: montée en 15 min.
70°C	: stationnement d'une heure
70°C à 85°C	: montée en 15 min.
85°C	: stationnement de 30 min.

On élimine la drêche par centrifugation, le pH est corrigé à pH 5,2 par HCl , la densité est ajustée à 12 °Pl et l'on bout sous reflux une heure.

b) Caractéristiques

Voir tableau 1 p.47

CARACTERISTIQUES DES MOUTS ET DES BIERES PRODUITS

		Malt		Orge	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
<u>M o u t</u>					
Extrait	° Pl.	12,0	12,0	12,0	12,0
Extrait limite	° Pl.	2,0	2,1	2,6	2,7
Atténuation limite	%.	83,3	82,5	78,3	77,5
ph		5,2	5,1	5,2	5,2
Coloration	E.B.C.	12,0	12,0	8,5	8,5
Azote	mg/100 ml.	123,0	123,0	103,0	100,0
<u>B i è r e</u>					
Extrait primitif	° Pl.	12,0	12,0	12,0	12,0
Extrait apparent	° Pl.	2,0	2,1	2,6	2,7
Extrait réel	° Pl.	3,9	4,0	4,4	4,5
Alcool	%.	4,2	4,1	3,9	3,9
Atténuation apparente	%.	83,3	82,5	78,3	77,5
ph		4,3	4,3	4,4	4,4
Coloration	E.B.C.	9,0	9,0	6,0	6,0
Azote	mg/100 ml.	81,2	85,6	77,5	79,1

6. BIERES DE MALT ET BIERES D'ORGE

a) Préparation

Les moûts décrits ci-dessus ont été fermentés jusque la limite dans des colonnes E.B.C. de 2 l. et thermostatisées à 10°C.

Les moûts ont étéensemencés avec 10 gr. de levure centrifugée du type *Saccharomyces carlsbergensis* poussièreux. La durée des fermentations était de 5 à 7 jours.

b) Caractéristiques

Voir tableau 1 p.47

B. APPAREILS ANALYTIQUES UTILISES
=====

- Colonnes à chromatographie avec :-
 - 1. Amberlite IR 120, 28-35 mesh.
 - longueur : 50 cm. - diamètre : 3 cm.
 - 2. DEAE cellulose Whatman
 - longueur : 22 cm. - diamètre : 1 cm.
 - 3. Séphadex G25
 - longueur : 30 cm. - diamètre : 1 cm.
 - 4. Dowex 1 - x8, 200-400 mesh.
 - longueur : 20 cm. - diamètre : 0,9 cm.
- Fractionneuse LKB comprenant :-
 - pompe péristaltique
 - photomètre ($\lambda = 253$ nm avec enrégistreur)
 - compteur de gouttes
 - distributeur de fractions
 - récepteur à tubes
- Spectrophotomètres.
 - Beekman
 - Shimadzu
- Appareil de Craig sous vide du type Rotavapor.
- Ultrafiltre Amicon type Diaflo.
- Varigrad Boskamp Pleuger à 9 compartiments pour les gradients.

C. METHODES UTILISEES

=====

1. Dosage de l'azote par semi-micro-Kjeldahl

a) Principe

L'azote organique est minéralisé sous forme de sulfate d'ammonium, l'ammoniac est ensuite distillé et titré.

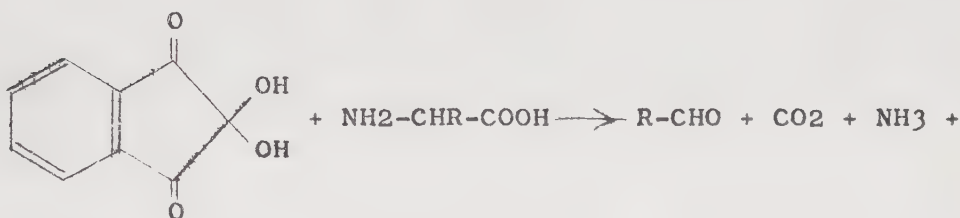
b) Mode opératoire

- Minéralisation : une prise maximale de 10 mg. d'azote est minéralisée par 2 ml. H_2SO_4 conc. en présence des catalyseurs K_2SO_4 (500 mg.) et HgO (50 mg.)
- Distillation : dans un appareil de Parnas, l'échantillon minéralisé est distillé en présence de 10 ml. d'une solution de soude à 40% contenant 3% de $Na_2S_2O_3$.
- L'ammoniac dégagé est reçu dans 5 ml. d'une solution d'acide borique préparée comme suit :-
 - 10 gr. acide borique dans 200 ml. d'éthanol
 - 700 ml. H_2O
 - 20 ml. éthanol contenant : 6,6 mg. vert de bromocrésol
13,2 mg. rouge de méthylCette solution est amenée à la zone de virage par $NaOH$.
- On titre ensuite par H_2SO_4 N/100 et l'on déduit du résultat obtenu, le titrage d'un blanc où l'échantillon est remplacé par de l'eau.
- La méthode est testée sur des prises connues d'acétalinide.

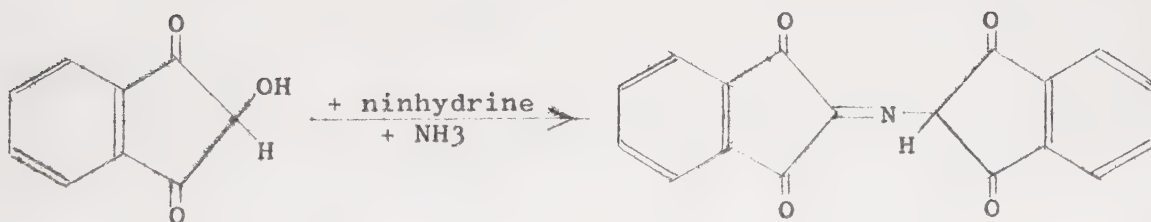
2. Dosage de l'azote α -aminé par la ninhydrine

a) Principe

La ninhydrine réagit sur le groupement α -aminé libre des acides aminés, des peptides, des protéines comme suit :



NINHYDRINE



HYDRINDANTINE

POURPRE DE RUHEMAN

b) Mode opératoire - Méthode E.B.C. (167)

L'échantillon doit contenir de 1 à 5 γ d'N α -aminé par ml., si la quantité est trop élevée, on dilue en conséquence.

Réactifs :-

- Solution 1 : 100 gr. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
60 gr. KH_2PO_4
5 gr. ninhydrine
3 gr. fructose
- } porter à 1 l. avec H_2O
- Solution 2 : 2 gr. KIO_3 dans 600 ml. H_2O auxquels on ajoute
400 ml. éthanol à 96%.

A deux ml. de l'échantillon est ajouté 1 ml. de la solution 1 (tamponnée à 6,6 - 6,8) et le tout plongé 16 min. au bain-marie bouillant.

Après refroidissement, on séjourne 20 min. dans un bain à 20°C et on ajoute 5 ml. de la solution 2. Ensuite lecture au spectrophotomètre à 570 nm après 20 min. maximum contre un blanc où l'échantillon a été remplacé par de l'eau

c) Courbe étalon

On part d'une solution d'alanine à 637 mg/l. ou 100 mg. N α -aminé/l. et l'on dilue en conséquence pour obtenir les échantillons suivants :-
1, 2, 3, 4, 5 γ d'N α - NH_2 /ml.

Les résultats sont portés sur un graphique (voir fig. 1 p.53)

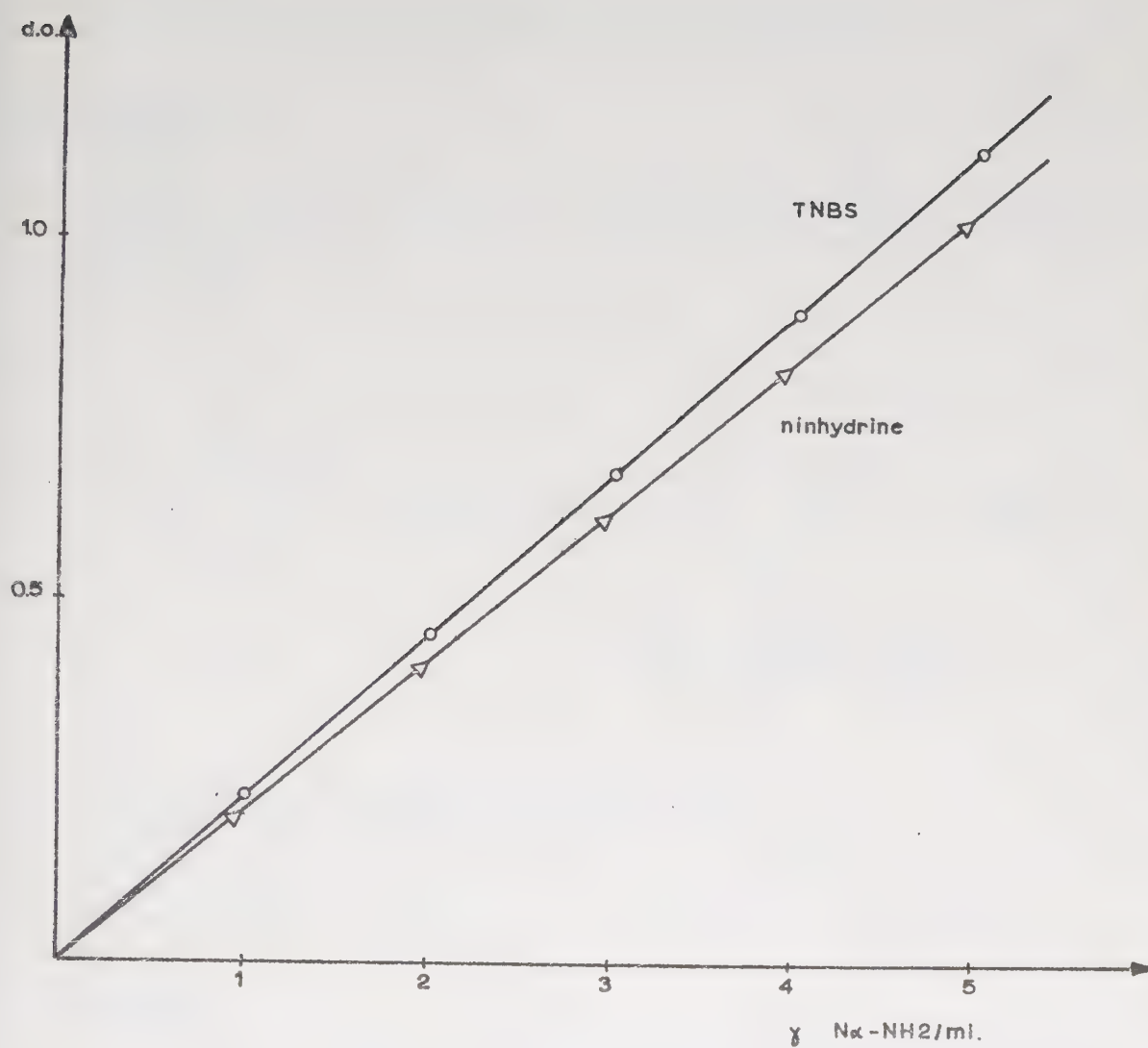


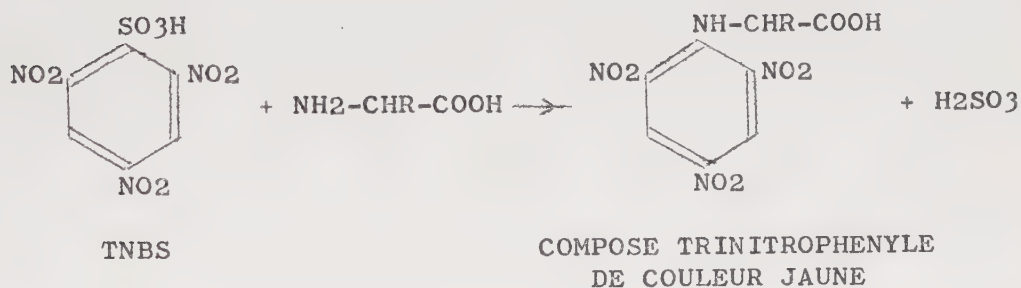
Figure N° 1: Courbes étalon de l'azote α -aminé

1. par le ninhydrine.
2. par le TNBS.

3. Dosage de l'azote α -aminé par le TNBS

a) Principe

L'acide 2-4-6-trinitrobenzène 1-sulfonique (TNBS) réagit sur le groupement α -aminé libre des acides aminés, peptides et protéines comme suit :-



b) Mode opératoire : Méthode de Satake (168)

L'échantillon doit contenir de 2 à 5 γ /ml. d'azote α -aminé.
Si la quantité est trop élevée on dilue en conséquence.

Réactifs :

- Solution 1 : TNBS : 0,1% à préparer au moment de l'utilisation.
- Solution 2 : Tampon
 - KH_2PO_4 0,1 M.
 - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,05 M. } ajuster à pH 8.

A deux ml. de l'échantillon sont ajoutés 2 ml. de la solution 1 et 2 ml. de la solution 2, le tout est immergé (à l'abri de la lumière) dans un bain thermostatisé à 40°C pendant deux heures.

On ajoute ensuite 2 ml. d' Hcl 0,1N et on lit au spectrophotomètre à 340 nm (U.V.) contre un blanc où l'échantillon a été remplacé par de l'eau.

c) Courbe étalon

Comme pour la ninhydrine, les résultats sont portés sur un graphique (voir fig. 1 p.53)

4. Hydrolyse des peptides et des protéines

a) Principe

Par action des ions H^+ à chaud, les liaisons peptidiques des peptides et des protéines sont rompues et ceux-ci transformés en leurs différents acides aminés.

b) Mode opératoire

A 5 ml. de l'échantillon sont ajoutés 20 ml. d'Hcl 6N.

On chauffe sous reflux au bain d'huile à 120°C pendant 20 heures et sous atmosphère d'azote.

Après hydrolyse Hcl est éliminé sous vide au Craig et en présence de soude.

c) Remarque

Nous nous sommes servis de cette méthode strictement standardisée, elle nous a donné le rendement optimum en azote α -aminé avec des résultats reproductibles (169-170).

5. Séparation sur Amberlite IR 120 des aminoacides et des peptides

L'étude des aminoacides et des peptides des moûts et des bières est fortement gênée par les autres composés qu'ils contiennent : sucres, polyphénols, protéines, etc...

a) Principe

Les aminoacides et les peptides neutres et basiques sont absorbés sur une résine cationique, les sucres, polyphénols, protéines, peptides acides ne le sont pas et peuvent donc être séparés par lavage à l'eau.

b) Mode opératoire : Méthode de Clapperton (115)

100 ml. du moût (ou de bière) sont coulés sur une colonne Amberlite IR 120 activée par Hcl 2N.

On lave par deux litres d'eau et l'on tient à part ces eaux de lavage qui contiennent entre autres les protéines et peptides acides.

On élue ensuite les aminoacides et les peptides neutres et basiques par 100 ml. d'ammoniaque 0,5 N suivis de 400 ml. 2 N. On lave ensuite à l'eau jusques à fin de réaction à la ninhydrine. Ces éluats sont rassemblés, ils contiennent les acides aminés et les peptides neutres et basiques.

c) Remarques

Certaines précautions doivent être prises :-

1. Tout le traitement doit se faire à 0°C au frigo, les solutions

utilisées doivent être glacées sous peine d'échauffement avec comme résultat une hydrolyse partielle et l'azote α -aminé plus important après passage sur la colonne qu'avant. Donc à chaque essai faire la balance de l'azote α -aminé.

2. A chaque nouvel essai la colonne doit être régénérée par la soude, car à 0°C l'affinité de l'ammoniac est telle que par simple lavage à l'eau il est impossible de l'éliminer complètement.

6. Chromatographie sur séphadex G25

a) Principe

Le séphadex G25 est un tamis moléculaire dans lequel les substances à poids moléculaire supérieur à 4000 passent dans le front du solvant (protéines) tandis que les substances à poids moléculaire inférieur (peptides) sont absorbées et ce d'autant plus qu'elles sont plus petites.

b) Mode opératoire

Une partie aliquote (20 ml.) des eaux de lavage de l'amberlite est concentrée à 1 ml. et coulée sur la colonne de séphadex G25.

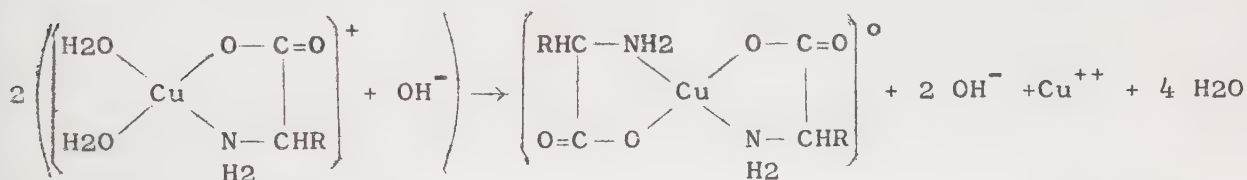
On élue par de l'eau bidistillée préalablement dégazée. On sépare en deux fractions le front du solvant et les éluats.

Le front du solvant est déterminé dans une expérience séparée où l'on sépare par chromatographie une solution de dextrane bleu (P.M. 2.10^6).

7. Séparation des acides aminés et des peptides

a) Principe: Méthode de Tommel et collaborateurs (114)

A pH 8, les complexes cuivriques des acides aminés basiques et neutres sont positifs ou neutres (fig.1), tandis que la charge d'un complexe cuivrique d'un peptide et d'un acide aminé acide est négative à ce pH (fig.2), à pH 7, ces derniers sont sous forme cationique (fig.3) et entre pH 8 et la neutralité nous avons deux formes intermédiaires (fig.4). Etant donné que la stabilité d'un complexe Cu^{++} peptide est moins grande que celle d'un complexe Cu^{++} acide aminé, la différence de charge des complexes peut donc être utilisée pour leur séparation.



COMPLEXE SIMPLE

COMPLEXE DOUBLE

fig. 1

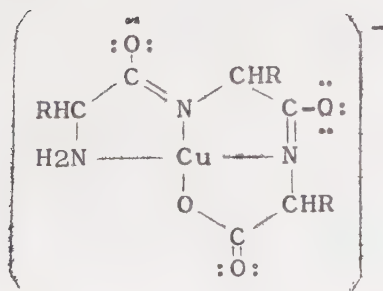


fig. 2

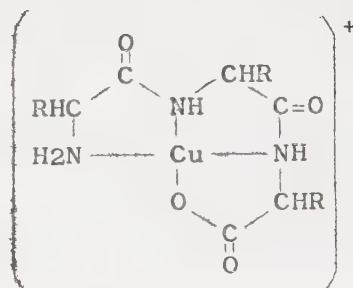


fig. 3

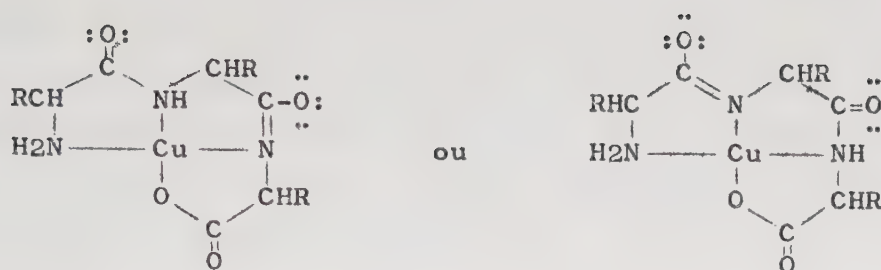


fig. 4

b) Mode opératoire

Les éluats ammoniacaux de l'amberlite IR 120 sont concentrés sous vide au Craig jusqu'à obtention d'une solution de 10 ml., puis complexés par l'ajoute d'un excès de carbonate de cuivre. L'excès non soluble est séparé des chélates solubles ainsi formés par filtration.

On chromatographie 2 cc de la solution ainsi obtenue sur une colonne de diéthylaminoéthyl cellulose, échangeuse anionique, sous forme acétate.

On élue par des tampons à ph décroissant :

1. Tampon collidine 0,01 M amené à ph 8 par l'acide acétique.
On obtient deux fractions (2 anneaux colorés bleus) fractions 1 et 2.
2. Tampon collidine 0,01 M amené à ph 4,5 par l'acide acétique.
On obtient la fraction 3 (anneau coloré bleu).
3. On élue la dernière fraction 4 (anneau jaune) par Hcl N/10.

Le cuivre est enlevé des éluats par extraction par la 8-Hydroxyquinoléine dissoute dans le chloroforme à raison de 6,5 mg/ml.

c) Remarque

La collidine du tampon utilisé, qui contient un atome d'N par molécule, est complètement solubilisée dans le chloroforme lors de l'extraction du cuivre, il n'y a donc pas lieu d'en tenir compte lors du dosage de l'azote.

8. Ultrafiltration des nucléotides

a) Principe

Le diaflo est une membrane qui ne laisse passer que des substances à poids moléculaire inférieur à 1000 et débarrasse donc les nucléotides du moût ou de la bière des substances qui gêneraient ultérieurement la chromatographie.

b) Mode opératoire : Méthode de Vanhemmens (171)

Pour faciliter l'ultrafiltration, on traite la bière avec son même volume d'acétone, l'acétone contenant un précipité gélatineux est écartée.

De même on traite la bière à l'AT (polyvinyl pyrrolidone insolubilisé sur un support) à raison 2 gr/l afin de la débarrasser des polyphénols qui réagissant avec les nucléotides, gêneront la chromatographie.

On alimente l'ultrafiltre Amicon par 200 ml de bière traitée comme indiqué ci-dessus, la pression est réglée à $3,5 \text{ kg/cm}^2$ par de l'azote, on agite prudemment et constamment.

Les 20 ml. de bière restants sont repris trois fois par un volume égal d'eau.

c) Remarque

L'opération est très longue, de deux à trois jours il faut donc éviter toute infection et travailler au frigo en utilisant du matériel stérilisé.

9. Chromatographie des nucléotides

a) Principe

Les nucléotides sont chromatographiés sur une résine échangeuse d'anions Dowex 1-x8 par un gradient de ph.

b) Mode opératoire : Méthode de Lento et collaborateurs (172).

L'échantillon de bière préalablement purifiée par ultrafiltration est concentré au Craig à 2 ml, lesquels sont coulés sur la colonne de Dowex 1-x8 sous forme formiate.

On lave à l'eau jusques à fin d'absorption à 253 nm et on élue par le gradient suivant au Varigrad :

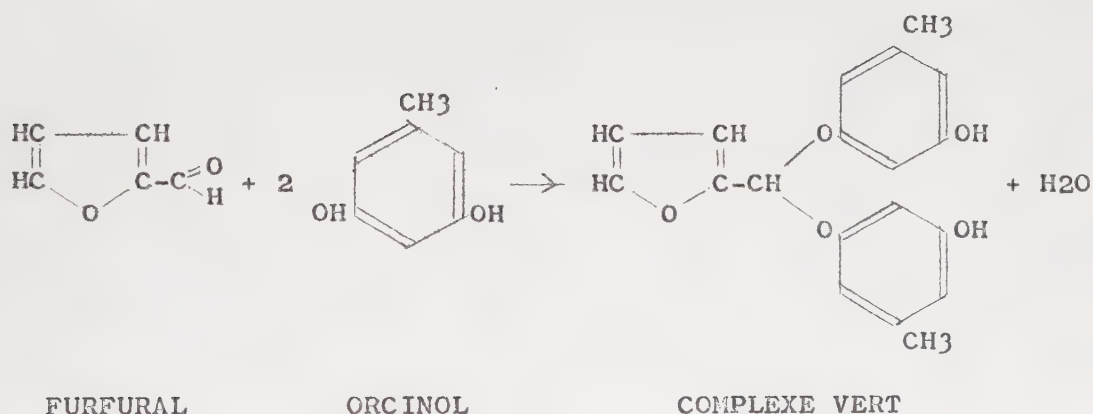
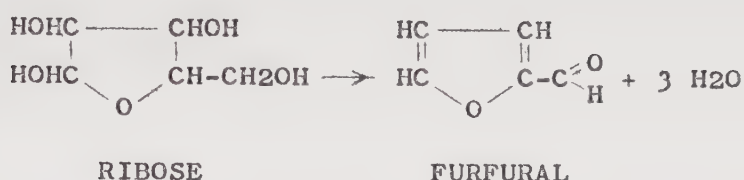
-	Compartiment 1	:	250 ml H2O bidistillée	
-	"	2 :	"	"
-	"	3 :	"	Acide formique 0,5 N
-	"	4 :	"	"
-	"	5 :	"	Formiate de sodium 0,2 N
-	"	6 :	"	"
-	"	7 :	"	"
-	"	8 :	"	"

Le débit est réglé à 1 ml/min.

10. Dosage du ribose

a) Principe

En présence d'un acide, le ribose sous l'effet de la chaleur se transforme en furfuraldéhyde lequel réagit avec l'orcinol pour donner une coloration verte :-



b) Mode opératoire : Méthode de Umbreit et collaborateurs (173)

L'échantillon doit avoir une concentration en ribose comprise entre 0,2 et 1,0 x 10⁻⁴ molaire.

Réactif : 1% d'orcinol dans une solution Hcl conc. contenant 0,1% de FeCl₃.

A 1,5 ml. de l'échantillon sont ajoutés 3 ml. du réactif, le tout est plongé 30 min. au bain-marie bouillant.

Refroidir et lire à 670 nm au spectrophotomètre.

c) Courbe étalon

A partir d'une solution mère 10^{-3} molaire en ribose (150 mg/l) sont établis des échantillons 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 x 10^{-4} mol. Les résultats sont portés sur un graphique (voir fig.2 p.67)

d) Transformation en nucléotides

A chaque môle de ribose correspond une môle de nucléotide. Les P.M. et la quantité d'azote par môle de différents ribonucléotides sont les suivants :-

			A z o t e		
Nucléotides			P.M	Quant./môle	Nombre d'atomes
Inosine monophosphate	IMP		348	56	4N
Guanosine	"	GMP	363	70	5N
Adénosine	"	AMP	347	70	5N
Uridine	"	UMP	323	42	3N
Cytidine	"	CMP	324	28	2N
Thymidine	"	TMP	338	28	2N

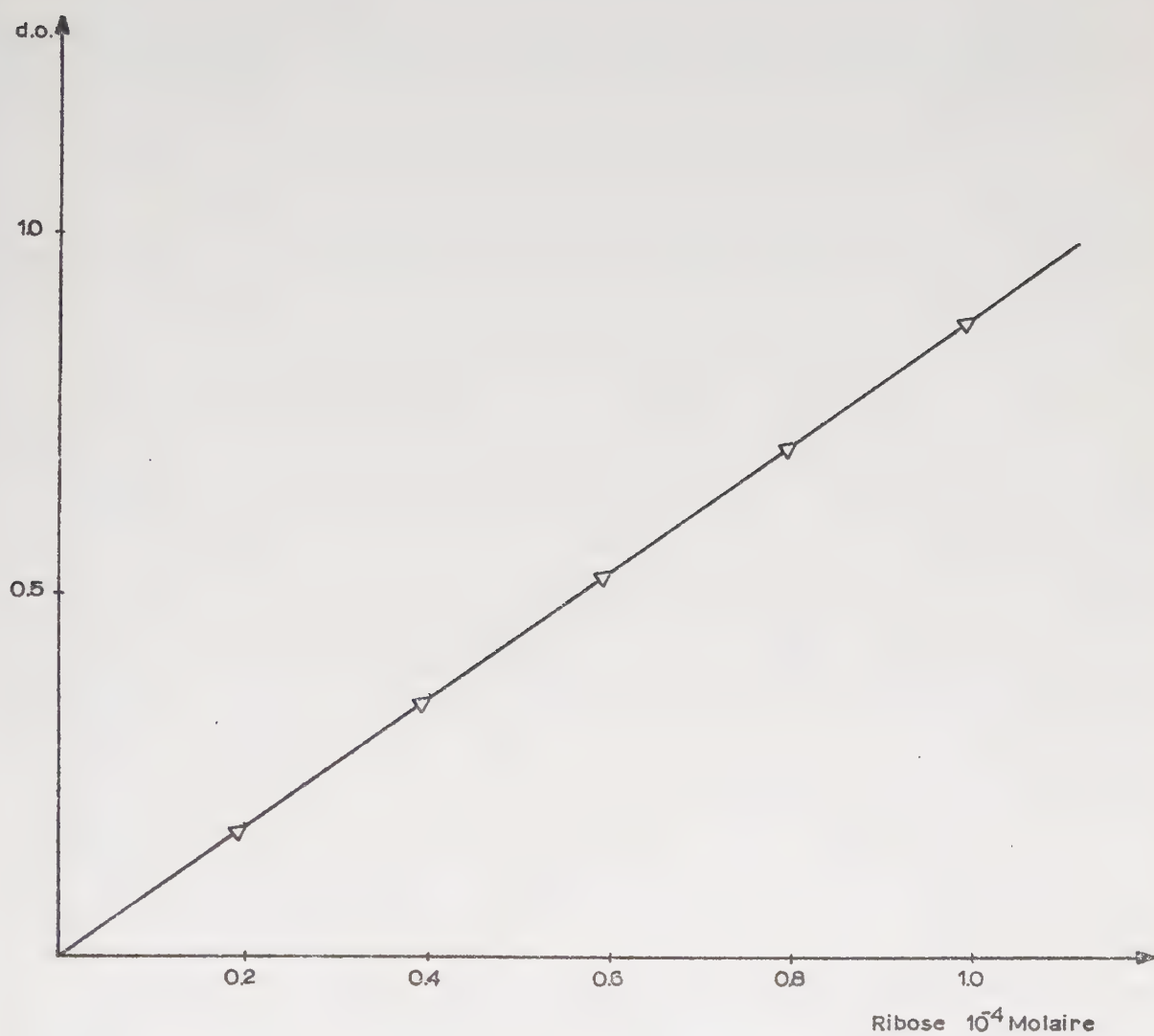


Figure N° 2: Courbe étalon du dosage du ribose par l'orcinol.

V. RESULTATS EXPERIMENTAUX

=====

A). ETUDE COMPARATIVE DE L'AZOTE PEPTIDIQUE DES MOÛTS ET BIERES

=====

DE MALT ET D'ORGE.

=====

1. PROFIL DE L'AZOTE PEPTIDIQUE

a). ETABLISSEMENT D'UNE METHODE DE TRAVAIL

Dans des moûts préparés à partir d'orges attaquées par des protéases ou à partir de malt, il n'y a pas lieu de s'attendre, ainsi que nous l'avons vu dans la revue bibliographique, à des différences qualitatives importantes, tant dans les protéines que dans leurs produits de dégradation, peptides et aminoacides, par contre des différences quantitatives peuvent exister ainsi que cela a déjà été démontré pour les acides aminés.

Dans les bières, il sera intéressant de suivre l'évolution de ces différences.

Le fractionnement mis au point (voir fig.3 p.69) est basé sur une triple technique :

Sur résine cationique nous séparons d'une part les protéines, polypeptides et peptides acides : fraction IA, des acides aminés et peptides neutres et basiques : fraction IB (Méthode No.5 p.57).

Sur séphadex G25, nous séparons les protéines fraction IA1, des polypeptides et peptides acides : fraction IA2 (Méthode No.6 p.59).

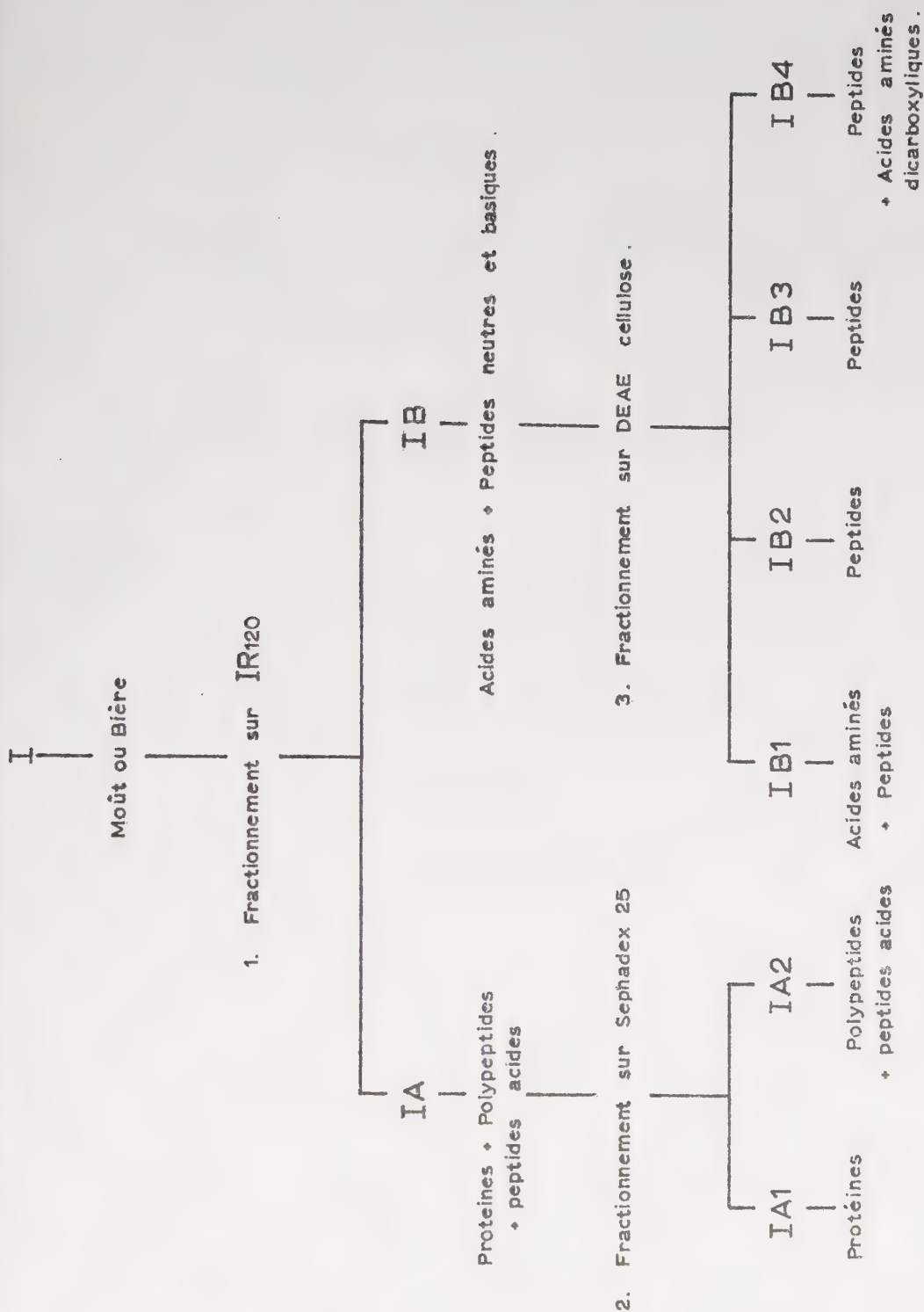


Figure N° 3 SCHEMA DE FRACTIONNEMENT DE L' AZOTE.

Enfin sur DEAE cellulose nous séparons les acides aminés : fraction IB1, des peptides, lesquels sont divisés en trois classes de complexité progressive : fractions IB2, IB3, IB4 (Méthode No.7 p.60).

En résumé, le profil azoté ainsi obtenu se compose de 6 fractions de complexité différente allant des simples acides aminés jusqu' aux protéines.

Nous avons établi ensuite le bilan azoté pour chaque fraction des moûts et des bières produits et avons tâché d'étudier la complexité des différentes fractions : pour ce, nous nous sommes basés sur une triple technique :

- a) Détermination de l'azote total.
- b) Détermination de l'azote α -aminé.
- c) Degré de complexité.

Remarque :-

Pour la facilité du langage, nous dirons moûts d'orge et bières d'orge, pour les moûts et bières fabriqués à partir d'orge solubilisée par voie enzymatique, en opposition avec moûts et bières de malt, où la même orge est préalablement maltée.

b). AZOTE TOTAL

(voir tableaux 2 à 5, p.73 à 76).

Par cette méthode remarquablement précise nous avons pu établir le bilan de l'azote pour chaque moût et bière produits et ainsi vérifier que les méthodes de fractionnement utilisées donnaient des résultats corrects et reproductibles (voir méthode No.1 p.50). A cet effet nous avons doublé tous nos essais.

Pour chaque fractionnement le rendement, % R, a été calculé en pourcentage de la quantité initiale, le rendement minimum était de 91,8% et le rendement moyen de 95,6% ce qui est satisfaisant vu la complexité des techniques utilisées.

Explication des tableaux

La colonne 1 mentionne le nom de la fraction conformément au schéma de fractionnement (fig.3 p.69).

Les colonnes 2 et 3 donnent les résultats expérimentaux de deux expériences, les caractéristiques des moûts ou des bières analysés étant reprises dans le tableau 1 p.47, la colonne 4 donne la moyenne des deux essais.

La colonne 5 donne les différents pourcentages par rapport aux fractions I, IA, et IB.

La colonne 6 donne ces mêmes pourcentages mais par rapport à I.

Enfin la colonne 7 donne les résultats finaux, c'est-à-dire recalculés en tenant compte des pertes, en somme c'est la fraction I x par les pourcentages de la colonne 6.

Remarques :-

1. Dans la fraction IB, il subsiste une quantité d'ammoniac provenant de l'élution de l'amberlite et qui ne disparaît pas entièrement lors de la concentration au Craig, nous avons déduit l'azote contenu dans l'ammoniac des résultats obtenus en le dosant par distillation directe au Parnas.
2. Nous avons opéré de même pour la fraction IB1 où l'ammoniac passe avec les aminoacides.

Tableau 2.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE
=====

MOUT DE MALT

Fraction	mg N/100 ml.					
	Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
	1	2	Moy.	Fraction	Total	
I	123	123	123,0	100,0	100,0	123,0
IA	41,2	44,4	42,8	36,7	36,7	45,1
IB	73,4	74,0	73,7	63,3	63,3	77,9
Total	114,6	118,4	116,5	100,0	100,0	123,0
% R	93,2	96,3	94,7			
IA1	13,7	12,9	13,3	32,4	11,9	14,6
IA2	26,1	29,3	27,7	67,6	24,8	30,5
Total	39,8	42,2	41,0	100,0	36,7	45,1
% R	96,6	95,0	95,8			
IB1	48,5	49,0	48,75	66,8	42,3	52,0
IB2	8,5	8,3	8,4	11,5	7,3	9,0
IB3	8,7	8,4	8,55	11,7	7,4	9,1
IB4	7,2	7,4	7,3	10,0	6,3	7,8
Total	72,9	73,1	73,00	100,0	63,3	77,9
% R	99,3	98,8	99,1			

voir explications p.71.

Tableau 3.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE
=====

MOUT D'ORGE

Fraction	mg N/100 ml.					
	Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
	1	2	Moy.	Fraction	Total	
I	100,0	103,0	101,5	100,0	100,0	101,5
IA	38,0	39,4	38,7	38,8	38,8	39,4
IB	<u>60,0</u>	<u>62,3</u>	<u>61,15</u>	<u>61,2</u>	<u>61,2</u>	<u>62,1</u>
Total	98,0	101,7	99,85	100,0	100,0	101,5
% R	98,0	98,7	98,4			
IA1	18,6	19,6	19,1	51,4	19,9	20,2
IA2	<u>17,6</u>	<u>18,5</u>	<u>18,05</u>	<u>48,6</u>	<u>18,9</u>	<u>19,2</u>
Total	36,2	38,1	37,15	100,0	38,8	39,4
% R	95,3	96,7	96,0			
IB1	23,8	22,6	23,2	40,0	24,5	24,9
IB2	14,9	17,6	16,25	28,0	17,1	17,3
IB3	12,6	13,3	12,95	22,4	13,7	13,9
IB4	<u>5,1</u>	<u>6,0</u>	<u>5,55</u>	<u>9,6</u>	<u>5,9</u>	<u>6,0</u>
Total	56,4	59,5	57,95	100,0	61,2	62,1
% R	94,0	95,5	94,8			

voir explications p.71.

Tableau 4.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE
=====

BIERE DE MALT

Fraction	mg N/100 ml.					
	Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
	1	2	Moy.	Fraction	Total	
I	81,2	85,6	83,4	100,0	100,0	83,4
IA	33,9	36,7	35,3	44,3	44,3	36,9
IB	<u>43,8</u>	<u>44,8</u>	<u>44,3</u>	<u>55,7</u>	<u>55,7</u>	<u>46,5</u>
Total	77,7	81,5	79,6	100,0	100,0	83,4
% R	95,7	95,2	95,4			
IA1	10,1	10,3	10,2	31,4	13,9	11,6
IA2	<u>21,2</u>	<u>23,4</u>	<u>22,3</u>	<u>68,6</u>	<u>30,4</u>	<u>25,3</u>
Total	31,3	33,7	32,5	100,0	44,3	36,9
% R	92,3	91,8	92,1			
IB1	24,9	26,4	25,65	61,4	34,2	28,5
IB2	2,6	2,3	2,45	5,9	3,3	2,8
IB3	4,0	4,8	4,4	10,5	5,8	4,9
IB4	<u>9,2</u>	<u>9,4</u>	<u>9,3</u>	<u>22,2</u>	<u>12,4</u>	<u>10,3</u>
Total	40,7	42,9	41,80	100,0	55,7	46,5
% R	92,9	95,8	94,4			

voir explications p.71.

Tableau 5.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE
=====

BIERE D'ORGE

Fraction	mg N/100 ml.					
	Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
	1	2	Moy.	Fraction	Total	
I	77,5	79,1	78,3	100,0	100,0	78,3
IA	30,5	35,1	32,8	44,8	44,8	35,1
IB	<u>42,0</u>	<u>38,9</u>	<u>40,45</u>	<u>55,2</u>	<u>55,2</u>	<u>43,2</u>
Total	72,5	74,0	73,25	100,0	100,0	78,3
% R	93,5	93,5	93,5			
IA1	16,4	18,8	17,6	53,7	24,1	18,9
IA2	<u>14,5</u>	<u>15,9</u>	<u>15,2</u>	<u>46,3</u>	<u>20,7</u>	<u>16,2</u>
Total	30,9	34,7	32,8	100,0	44,8	35,1
% R	101,3	98,9	100,0			
IB1	16,3	14,0	15,15	40,8	22,5	17,6
IB2	8,3	7,7	8,0	21,5	11,9	9,3
IB3	6,7	5,9	6,3	17,0	9,4	7,4
IB4	<u>7,8</u>	<u>7,6</u>	<u>7,7</u>	<u>20,7</u>	<u>11,4</u>	<u>8,9</u>
Total	39,1	35,2	37,15	100,0	55,2	43,2
% R	93,1	90,5	91,8			

voir explications p.71.

c). AZOTE α -AMINE

(voir tableaux 6 à 9 p.79 à 82)

Cette méthode est nettement moins précise que l'azote total de par son principe même, en effet l'azote α -aminé des différents composés réagit chaque fois d'une manière spécifique (étude de Bateson - 174) avec des variations importantes, c'est pourquoi nous avons utilisé deux méthodes d'analyses, par la ninhydrine et le TNBS (voir méthodes No.2 p.51 et No.3 p.54).

Nous avons déterminé l'azote α -aminé dans les fractions simples, IB1, 2, 3, 4 et dans le moût et la bière, dans la fraction IA nous l'avons calculé par différence car l'analyse n'était pas possible vu l'interférence des autres substances du moût ou de la bière, fortement colorées par oxydation durant le fractionnement.

Explication des tableaux

La colonne 1 donne les fractions.

Les colonnes 2 et 3 donnent les résultats de deux expériences différentes tandis que la colonne 4 en donne la moyenne.

Les colonnes 5, 6 et 7 ont été calculées comme pour l'azote total.

Remarque :- Nous avons tenu compte de l'ammoniac comme pour l'azote total, cependant en appliquant les résultats de Bateson nous étions incapables de balancer nos bilans pour les raisons suivantes :-

1. Contrairement à l'assertion que le TNBS ne réagit pas avec l'ammoniac nous avons trouvé une réaction partielle.
2. Dans la méthode à la ninhydrine, l'ammoniac réagit à 98% si le réducteur utilisé est le SnCl_2 mais beaucoup moins si le réducteur est du fructose.

Nous avons donc dosé l'ammoniac par le TNBS et la ninhydrine et avons obtenu les résultats suivants :-

NH ₃ / ml.	Rendement de la réaction	
	TNBS	Ninhydrine
1	10,7	32,7
2	10,9	32,7
3	10,7	33,0
4	10,9	32,8
Moyenne	10,8	32,8

Ces résultats viennent d'être confirmés dans une publication toute récente par le Comité d'Analyses de l'E.B.C. (181).

Tableau 6.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE α -AMINE

MOUT DE MALT

Méthode	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
		1	2	Moy.	Fraction	Total	
Ninhydrine	I	28,3	30,7	29,5	100,0	100,0	29,5
	IA*	-	-	2,8	9,5	9,5	2,8
	IB	25,4	28,0	26,7	90,5	90,5	26,7
	IB1	18,8	20,4	19,60	85,9	77,7	22,93
	IB2	2,0	2,0	2,00	8,8	8,0	2,35
	IB3	0,92	0,90	0,91	4,0	3,6	1,07
	IB4	0,31	0,31	0,31	1,3	1,2	0,35
	Total	22,03	23,61	22,82	100,0	90,5	26,70
	% R.	86,7	84,3	85,5			
TNBS	I	32,9	35,1	34,0	100,0	100,0	34,0
	IA*	-	-	3,9	11,5	11,5	3,9
	IB	29,0	31,2	30,1	88,5	88,5	30,1
	IB1	24,0	25,8	24,90	88,0	77,9	26,49
	IB2	2,0	2,0	2,00	7,1	6,3	2,14
	IB3	1,12	1,01	1,07	3,8	3,3	1,14
	IB4	0,29	0,31	0,30	1,1	1,0	0,33
	Total	27,41	29,12	28,27	100,0	88,5	30,10
	% R.	94,5	93,3	93,9			

* déterminé par calcul : IA = I - IB

voir explications p.77.

Tableau 7.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE (X)-AMINE

=====

MOUT D'ORGE

Méthode	Fraction	mg N (X)-NH ₂ /100 ml.					
		Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
		1	2	Moy.	Fraction	Total	
Ninhydrine	I	19,5	22,0	20,75	100,0	100,0	20,8
	IA*	-	-	4,20	20,2	20,2	4,2
	IB	16,0	17,1	16,55	79,8	79,8	16,6
	IB1	10,4	10,8	10,60	68,8	54,9	11,42
	IB2	3,3	3,5	3,40	22,1	17,6	3,67
	IB3	1,13	1,14	1,14	7,4	5,9	1,23
	IB4	0,23	0,29	0,26	1,7	1,4	0,28
	Total	15,06	15,73	15,40	100,0	79,8	16,60
	% R.	94,1	92,0	93,1			
TNBS	I	22,0	24,0	23,0	100,0	100,0	23,0
	IA*	-	-	5,5	23,9	23,9	5,5
	IB	17,0	18,0	17,5	76,1	76,1	17,5
	IB1	11,5	11,8	11,65	68,7	52,3	12,02
	IB2	3,9	3,3	3,60	21,2	16,1	3,71
	IB3	1,39	1,50	1,45	8,5	6,5	1,49
	IB4	0,25	0,29	0,27	1,6	1,2	0,28
	Total	17,04	16,89	16,97	100,0	76,1	17,50
	% R.	100,2	93,8	97,0			

*déterminé par calcul : IA = I - IB

voir explications p.77.

Tableau 8.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE α -AMINE

BIERE DE MALT

Méthode	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
		1	2	Moy.	Fraction	Total	
Ninhydrine	I	10,8	11,3	11,05	100,0	100,0	11,1
	IA*	-	-	0,30	2,7	2,7	0,3
	IB	10,6	10,9	10,75	97,3	97,3	10,8
	IB1	9,0	9,6	9,30	87,5	85,1	9,45
	IB2	0,45	0,56	0,51	4,8	4,7	0,52
	IB3	0,38	0,29	0,34	3,2	3,1	0,34
	IB4	0,45	0,50	0,48	4,5	4,4	0,49
	Total	10,28	10,95	10,63	100,0	97,3	10,80
TNBS	I	12,9	14,1	13,5	100,0	100,0	13,5
	IA*	-	-	0,45	3,3	3,3	0,5
	IB	12,5	13,6	13,05	96,7	96,7	13,0
	IB1	10,9	10,3	10,60	86,5	83,7	11,24
	IB2	0,57	0,47	0,52	4,2	4,1	0,55
	IB3	0,45	0,67	0,56	4,6	4,4	0,60
	IB4	0,56	0,58	0,57	4,7	4,5	0,61
	Total	12,48	12,02	12,25	100,0	96,7	13,00
	% R.	99,8	88,3	93,9			

* déterminé par calcul : IA = I - IB

Tableau 9.

FRACTIONNEMENT DE L'AZOTE α -AMINE

=====

BIERE D'ORGE

M é t h o d e	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Expérience			Pourcentage sur		Résultats finaux
		1	2	Moy.	Fraction	Total	
N i n h y d r i n e	I	10,1	9,0	9,55	100,0	100,0	9,6
	IA*	-	-	1,00	10,5	10,5	1,0
	IB	8,7	8,4	8,55	89,5	89,5	8,6
	IB1	5,4	4,8	5,10	68,1	61,0	5,86
	IB2	1,65	1,31	1,48	19,7	17,6	1,69
	IB3	0,59	0,53	0,56	7,5	6,7	0,65
	IB4	<u>0,35</u>	<u>0,35</u>	<u>0,35</u>	<u>4,7</u>	<u>4,2</u>	<u>0,40</u>
	Total	7,99	6,99	7,49	100,0	89,5	8,60
	% R.	91,8	83,2	87,6			
T N B S	I	11,5	10,0	10,75	100,0	100,0	10,8
	IA*	-	-	1,20	11,2	11,2	1,2
	IB	10,1	9,0	9,55	88,8	88,8	9,6
	IB1	6,0	6,1	6,05	64,8	57,5	6,22
	IB2	2,5	1,9	2,20	23,5	20,9	2,26
	IB3	0,81	0,57	0,69	7,4	6,6	0,71
	IB4	<u>0,40</u>	<u>0,39</u>	<u>0,40</u>	<u>4,3</u>	<u>3,8</u>	<u>0,41</u>
	Total	9,71	8,96	9,34	100,0	88,8	9,60
	% R.	96,1	99,6	97,8			

* déterminé par calcul : IA = I - IB

voir explications p.77.

d). DEGRE DE COMPLEXITE
=====

(voir tableaux 10 à 12 p.85 à 88)

Il était intéressant de vérifier la complexité des fractions pures obtenues, aminoacides et peptides, IB1, 2, 3, 4, pour ce, nous avons déterminé l'azote α -aminé avant et après hydrolyse (voir méthode No.4 p.56).

Pour les fractions complexes, ce même traitement est trop aléatoire et la précision est trop sujette à caution vu la faible quantité d'azote α -aminé avant hydrolyse d'une part, et d'autre part l'interférence des substances non protéiques durant l'hydrolyse.

Le rapport entre azotes α -aminés après et avant hydrolyse ne donne pas exactement l'image du nombre moyen d'acides aminés par fraction peptidique mais seulement l'ordre de grandeur minimum pour les raisons suivantes :-

Pendant l'hydrolyse :-

1. Le rendement de la plupart des acides aminés est compris entre 95% et 100%.
2. Certains aminoacides sont partiellement détruits comme la sérine et la thréonine (5 à 15%) ou même complètement comme le tryptophane.
3. La proline produite pendant l'hydrolyse n'est pas dosée.
4. Les liaisons valine, leucine et isoleucine sont très stables et nécessitent un temps plus long qui ne peut être atteint sous peine de détruire certains acides aminés déjà libérés.

Explication des tableaux

Colonne 1 : la première série de résultats sont repris des tableaux 6 à 9 et donne donc l'azote α -aminé des différentes fractions, la deuxième série de résultats donne l'azote α -aminé des mêmes fractions après hydrolyse, tandis que la troisième série donne le rapport des deux

séries précédentes ce que nous avons appelé degré de complexité.

Les colonnes 2 et 3 donnent les résultats expérimentaux de deux essais différents avec la ninhydrine, la colonne 4 leur moyenne.

Les colonnes 5 et 6 donnent les résultats expérimentaux de deux essais différents mais cette fois avec le TNBS, la colonne 7, leur moyenne.

Remarque :

Nous avons été étonnés de la différence existant entre l'azote total et l'azote α -aminé après hydrolyse (voir tableaux 2 à 5 p.73 à 76 et 6 à 9 p.79 à 82 et aussi tableaux récapitulatifs 13 à 17 p.106 à 109).

Le rapport azote total sur azote α -aminé après hydrolyse est assez stable et voisin de 2 (variant de 1,7 à 2,2 pour la ninhydrine et de 1,6 à 2,5 pour le TNBS).

A l'analyse cependant ces résultats sont très logiques vu les raisons suivantes :-

1. Le rendement d'hydrolyse était optimal mais inférieur à la réalité.
2. Et surtout, certains aminoacides contiennent à côté de l'azote α -aminé d'autres atomes d'azote, la lysine (1), l'histidine (2) et l'arginine (3) (cfr. étude Clapperton : 116).

Tableau 10.

AZOTE α -AMINE AVANT ET APRES HYDROLYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS

MOUT DE MALT

	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Ninhydrine			TNBS		
		Exp. 1	Exp. 2	Moy.	Exp. 1	Exp. 2	Moy.
A. h = y a d v r a o n l y s e	IB1	18,8	20,4	19,60	24,0	25,8	24,90
	IB2	2,0	2,0	2,00	2,0	2,0	2,00
	IB3	0,92	0,90	0,91	1,12	1,01	1,07
	IB4	<u>0,31</u>	<u>0,31</u>	<u>0,31</u>	<u>0,29</u>	<u>0,31</u>	<u>0,30</u>
	Total	22,03	23,61	22,82	27,41	29,12	28,27
B. h = y a d p r r o è l s y s e	IB1	22,6	24,5	23,55	26,4	29,7	28,05
	IB2	4,9	4,0	4,45	5,3	4,5	4,90
	IB3	4,6	4,6	4,60	5,3	4,4	4,85
	IB4	<u>4,0</u>	<u>3,3</u>	<u>3,65</u>	<u>3,9</u>	<u>3,5</u>	<u>3,70</u>
	Total	36,1	36,4	36,25	40,9	42,1	41,50
C.R = a p p o r t : B/A	IB1	1,20	1,20	1,20	1,10	1,15	1,13
	IB2	2,45	2,00	2,23	2,65	2,25	2,45
	IB3	5,00	5,11	5,05	4,73	4,36	4,53
	IB4	<u>12,90</u>	<u>10,64</u>	<u>11,77</u>	<u>13,45</u>	<u>11,29</u>	<u>12,33</u>
	Moy.	1,64	1,54	1,59	1,49	1,45	1,47

voir explications p.83.

Tableau 11.

AZOTE α -AMINE AVANT ET APRES HYDROLYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS

MOUT D'ORGE

	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Ninhydrine			TNBS		
		Exp. 1	Exp. 2	Moy.	Exp. 1	Exp. 2	Moy.
A. h = y a d v r a o n l t y s e	IB1	10,4	10,8	10,60	11,5	11,8	11,65
	IB2	3,3	3,5	3,40	3,9	3,3	3,60
	IB3	1,13	1,14	1,14	1,39	1,50	1,45
	IB4	<u>0,23</u>	<u>0,29</u>	<u>0,26</u>	<u>0,25</u>	<u>0,29</u>	<u>0,27</u>
	Total	15,06	15,73	15,40	17,04	16,89	16,97
B. h = y a d p r o l è s y s e	IB1	12,1	12,1	12,10	13,5	14,2	13,85
	IB2	7,8	9,4	8,60	7,7	7,2	7,45
	IB3	7,5	7,9	7,70	5,7	7,5	6,60
	IB4	<u>3,2</u>	<u>3,6</u>	<u>3,40</u>	<u>3,1</u>	<u>3,8</u>	<u>3,45</u>
	Total	30,6	33,0	31,80	30,0	32,7	31,35
C.R = a p p o r t : B/A	IB1	1,15	1,12	1,14	1,17	1,20	1,19
	IB2	2,36	2,69	2,53	1,97	2,18	2,07
	IB3	6,64	6,93	6,75	4,10	5,00	4,55
	IB4	<u>13,91</u>	<u>12,41</u>	<u>13,08</u>	<u>12,40</u>	<u>13,10</u>	<u>12,78</u>
	Moy.	2,03	2,10	2,06	1,76	1,94	1,85

voir explications p.83.

Tableau 12.

AZOTE α -AMINE AVANT ET APRES HYDROLYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS

BIERE DE MALT

	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Ninhydrine			TNBS		
		Exp. 1	Exp. 2	Moy.	Exp. 1	Exp. 2	Moy.
A. h y a d v a n l y s e	IB1	9,0	9,6	9,30	10,9	10,3	10,60
	IB2	0,45	0,56	0,51	0,57	0,47	0,52
	IB3	0,38	0,29	0,34	0,45	0,67	0,56
	IB4	<u>0,45</u>	<u>0,50</u>	<u>0,48</u>	<u>0,56</u>	<u>0,58</u>	<u>0,57</u>
	Total	10,28	10,95	10,63	12,48	12,02	12,25
B. h y a d p r o l y s e	IB1	11,5	11,9	11,70	12,8	12,8	12,80
	IB2	1,0	1,2	1,10	1,4	1,1	1,25
	IB3	2,3	1,7	2,00	2,1	2,8	2,45
	IB4	<u>4,5</u>	<u>4,6</u>	<u>4,55</u>	<u>5,8</u>	<u>4,6</u>	<u>5,20</u>
	Total	19,3	19,4	19,35	22,1	21,3	21,70
C. R a p p o r t : B/A	IB1	1,28	1,24	1,26	1,17	1,24	1,21
	IB2	2,22	2,14	2,16	2,46	2,34	2,40
	IB3	6,05	5,86	5,88	4,67	4,18	4,38
	IB4	<u>10,00</u>	<u>9,20</u>	<u>9,48</u>	<u>10,36</u>	<u>7,93</u>	<u>9,12</u>
	Moy.	1,87	1,77	1,82	1,77	1,77	1,77

voir explications p.83.

Tableau 13.

AZOTE ~~α~~-AMINE AVANT ET APRES HYDROLYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS

BIERE D'ORGE

	Fraction	mg N α -NH ₂ /100 ml.					
		Ninhydrine			TNBS		
		Exp. 1	Exp. 2	Moy.	Exp. 1	Exp. 2	Moy.
A. h = y a d v r a o n l t y s e	IB1	5,4	4,8	5,10	6,0	6,1	6,05
	IB2	1,65	1,31	1,48	2,5	1,9	2,20
	IB3	0,59	0,53	0,56	0,81	0,57	0,69
	IB4	<u>0,35</u>	<u>0,35</u>	<u>0,35</u>	<u>0,40</u>	<u>0,39</u>	<u>0,40</u>
	Total	7,99	6,99	7,49	9,71	8,96	9,34
B. h = y a d p r o l s y s e	IB1	7,5	6,3	6,90	7,9	7,6	7,75
	IB2	4,0	3,4	3,70	5,8	5,1	5,45
	IB3	3,0	2,8	2,90	4,4	3,1	3,75
	IB4	<u>3,8</u>	<u>3,5</u>	<u>3,65</u>	<u>4,0</u>	<u>4,5</u>	<u>4,25</u>
	Total	18,3	16,0	17,15	22,1	20,3	21,20
C.R = a p p o r t : B/A	IB1	1,39	1,31	1,35	1,32	1,25	1,28
	IB2	2,42	2,59	2,50	2,32	2,68	2,48
	IB3	5,08	5,28	5,18	5,43	5,44	5,43
	IB4	<u>10,86</u>	<u>10,00</u>	<u>10,43</u>	<u>10,00</u>	<u>11,54</u>	<u>10,63</u>
	Moy.	2,29	2,29	2,29	2,28	2,27	2,27

voir explications p.83.

2. ANALYSE DES RESULTATS

a) FRACTION I.

(Résultats repris des tableaux 2 à 9 p.73 et 79)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	123,0	- 32	83,4
≠ %	- 17		- 6
Orge	101,5	- 23	78,3

Remarque : ≠ % signifie la différence en % entre les différents mûts et bières d'orge et de malt.

2) Azote α-aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhy- drine	Malt	29,5	- 62	11,1
	≠ %	- 30		- 14
	Orge	20,8	- 54	9,6
TNBS	Malt	34,0	- 60	13,5
	≠ %	- 32		- 20
	Orge	23,0	- 53	10,8

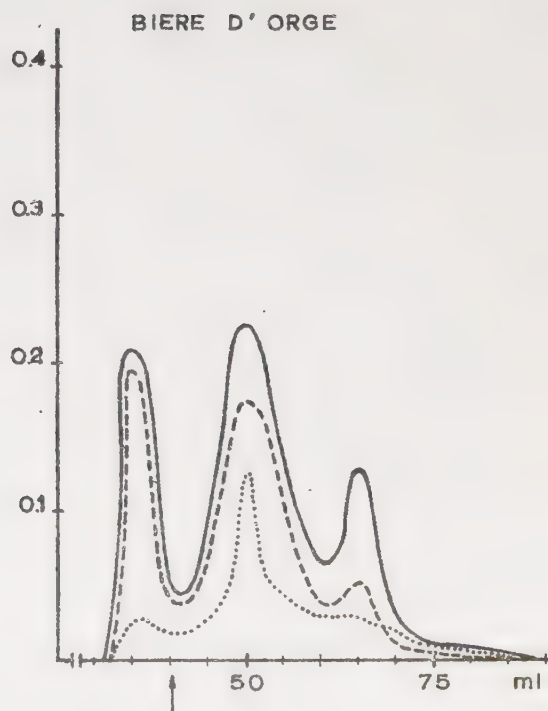
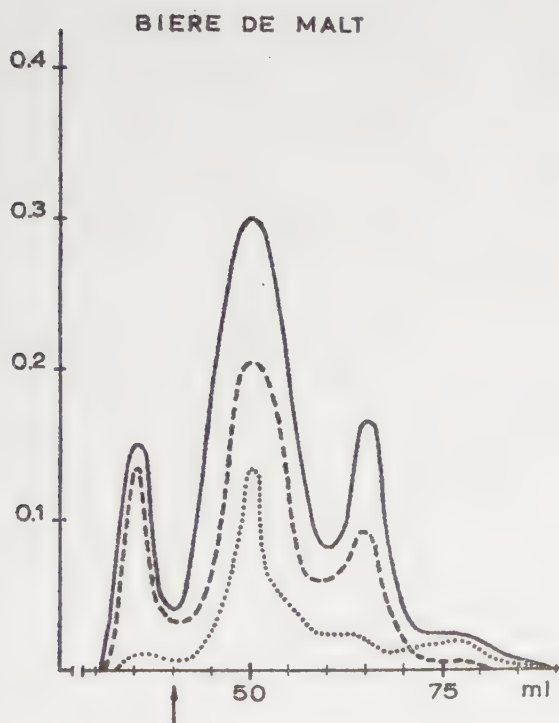
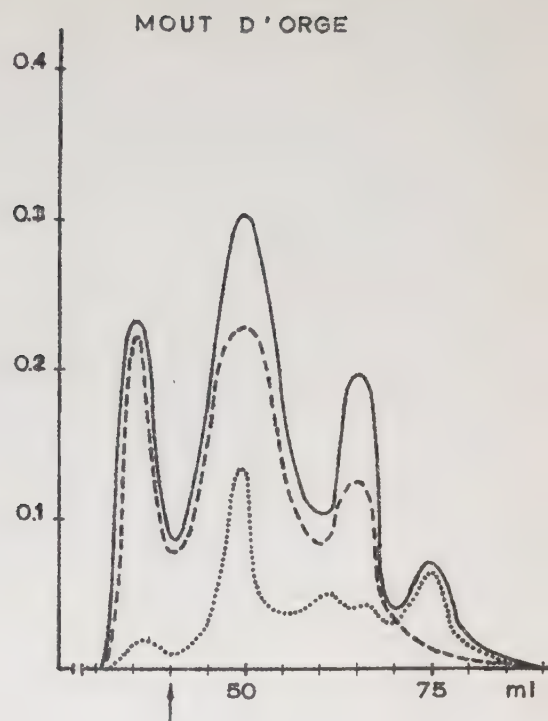
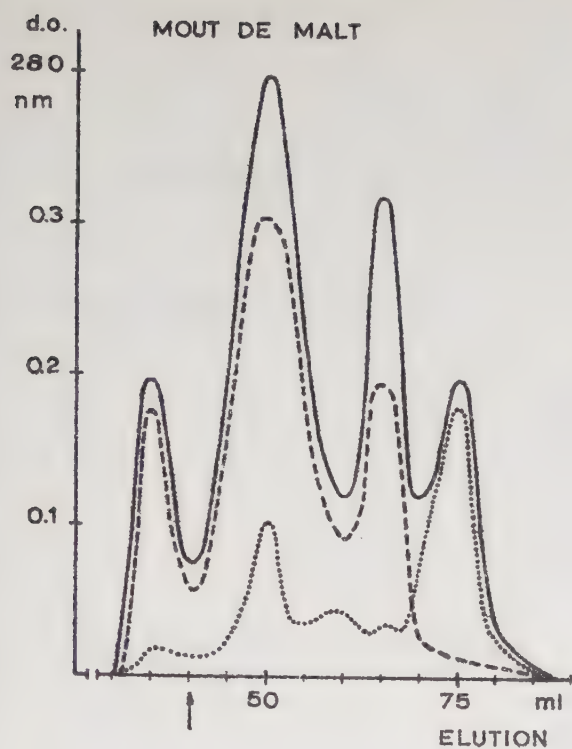
3) Commentaires

Les différences entre malt et orge sont plus importantes pour l'azote α-aminé que pour l'azote total, elles ont cependant tendance à s'atténuer dans les bières, l'azote total et l'azote α-aminé du moût de malt disparaissant durant la fermentation en plus forte proportion que pour

le moût d'orge.

Comme la séparation des fractions IA1 et IA2 était faite par chromatographie sur séphadex G25, nous avons pensé qu'il serait intéressant à titre comparatif d'établir ces mêmes courbes (fig.4 p.91) pour les moûts et les bières avant leur fractionnement sur résine cationique, bien que la distribution générale des pics soit différente entre les moûts de malt et d'orge d'une part et les bières correspondantes; d'autre part, l'allure générale de ces courbes est normale et correspond à ce que d'autres chercheurs ont trouvé (175-178).

Remarque : Nous donnons la courbe à 280 nm qui est la longueur d'onde où l'absorption des protéines est maximale, nous avons cependant établi ces courbes à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de l'azote nucléique, l'allure générale des courbes était la même et les quelques différences trop faibles que pour donner lieu à interprétation.



↑ front du solvant

— I Moût ou bière
 ----- IA Fraction non retenue sur Ambertite
 IB Fraction retenue sur Ambertite

Figure N° 4 CHROMATOGRAPHIES SUR SEPHADEX G 25

b) FRACTION IA.

(Résultats repris des tableaux 2 à 9 p.73 et 79)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	45,1	- 18	36,9
≠ %	- 13		- 5
Orge	39,4	- 11	35,1

2) Azote α-aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhy- drine	Malt	2,8	- 89	0,3
	≠ %	+ 50		+233
	Orge	4,2	- 76	1,0
TNBS	Malt	3,9	- 87	0,5
	≠ %	+ 41		+140
	Orge	5,5	- 78	1,2

3) Commentaires

Comme par séparation sur résine le but recherché était de débarrasser la fraction IB de toutes les substances non protéiques des moûts et des bières, l'azote de la fraction IA les renferme et nous ne connaissons pas de méthode pour les éliminer d'une manière quantitative. C'est pourquoi nous nous sommes limités au dosage de l'azote total, lequel ne présente pas de grandes différences; l'azote α-aminé a été calculé par différence entre les fractions I et IB, il se trouve en petite quantité quoique plus importante pour le moût d'orge, il disparaît en majeure partie durant la fermentation.

c) FRACTION IA1

(Résultats repris des tableaux 2 à 9 p.73 et 79)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	14,6	- 21	11,6
≠ %	+ 38		+ 63
Orge	20,2	- 7	18,9

2) Commentaires

Cette fraction IA1 renferme les protéines des moûts et des bières lesquelles sont plus abondantes pour l'orge que pour le malt.

Remarque : Cette fraction protéique passe avec le front du solvant lors de la chromatographie sur séphadex 25 (fig.4 p.91) son poids moléculaire est donc supérieur à 4000. Le front du solvant a été déterminé par ajoute d'une substance colorée à poids moléculaire élevé $2 \cdot 10^6$ le dextrane bleu dans un essai séparé, car par ajoute directe nous avons eu des difficultés d'obtenir des séparations nettes, lesquelles pourraient être expliquées par réaction sur les protéines (179).

d) FRACTION IA2

(Résultats repris des tableaux 2 à 9 p.73 et 79)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	30,5	- 17	25,3
≠ %	- 37		- 36
Orge	19,2	- 16	16,2

2) Commentaires

L'azote total de cette fraction IA2, renfermant les polypeptides (P.M. < 4000) et les peptides acides est plus abondant pour le moût et la bière de malt à l'inverse de la fraction IA1.

Si nous nous référons aux courbes de fractionnement sur séphadex (fig.4 p.91) nous nous apercevons que l'absorption de cette fraction (ainsi que IA1) est identique à celle des moûts ou des bières pour les premiers pics qui représentent les substances à poids moléculaire élevé mais s'en écarte en diminuant au fur et à mesure qu'on s'approche du dernier pic représentant les substances les plus simples, ce qui est logique.

e) FRACTION IB.

(Résultats repris des tableaux 2 à 13 p. 73,79 et 85)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	77,9	- 40	46,5
≠ %	- 20		- 7
Orge	62,1	- 30	43,2

2) Azote α -aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhy- drine	Malt	26,7	- 60	10,8
	≠ %	- 38		- 20
	Orge	16,6	- 48	8,6
TNBS	Malt	30,1	- 57	13,0
	≠ %	- 42		- 26
	Orge	17,5	- 45	9,6

3) Commentaires

Comme pour les moûts et les bières (fraction I), nous pouvons dire que les différences entre malt et orge sont plus importantes pour l'azote α -aminé que pour l'azote total, elles s'atténuent de moitié cependant pendant la fermentation.

La chromatographie sur séphadex de cette fraction (fig.4 p.91) qui contient les acides aminés et les peptides neutres et basiques, montre bien sa complexité.

f) FRACTION IB1.

(Résultats repris des tableaux 2 à 13 p.73,79 et 85)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	52,0	- 45	28,5
≠ %	- 52		- 38
Orge	24,9	- 29	17,6

2) Azote α-aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhy- drine	Malt	22,93	- 59	9,45
	≠ %	- 50		- 38
	Orge	11,42	- 49	5,86
TNBS	Malt	26,49	- 58	11,24
	≠ %	- 55		- 55
	Orge	12,02	- 48	6,22

3) Commentaires

Cette fraction IB1 renferme presque exclusivement des acides aminés ainsi que le montre le dosage de l'azote α-aminé avant et après hydrolyse (cfr. tableaux 10 à 13 p.85) cette contamination par des petits peptides pourrait provenir du léger chevauchement des fractions IB1 et IB2 (fig.5 p.98) lors de la séparation des chélates sur DEAE cellulose.

Cette fraction est donc primordiale pour la fermentation et les différences constatées entre orge et malt sont énormes du simple au double, une chose remarquable est à souligner, non seulement l'azote du moût de malt est assimilé en valeur absolue en plus grande quantité que l'azote du moût d'orge ce qui est logique, mais aussi en valeur

relative (%) ce qui l'est moins, à notre avis ce serait la raison pour laquelle nous avons attendu deux jours de plus pour atteindre la limite lors de la fermentation des moûts d'orge.

Remarque : lors du dosage de l'azote α -aminé, la proline n'est pas comprise ce qui en somme est un avantage vu le peu d'intérêt que montre la levure pour cet acide aminé, nous avons vu lors de notre étude bibliographique qu'il est plus abondant dans les moûts de malt que dans ceux d'orge.

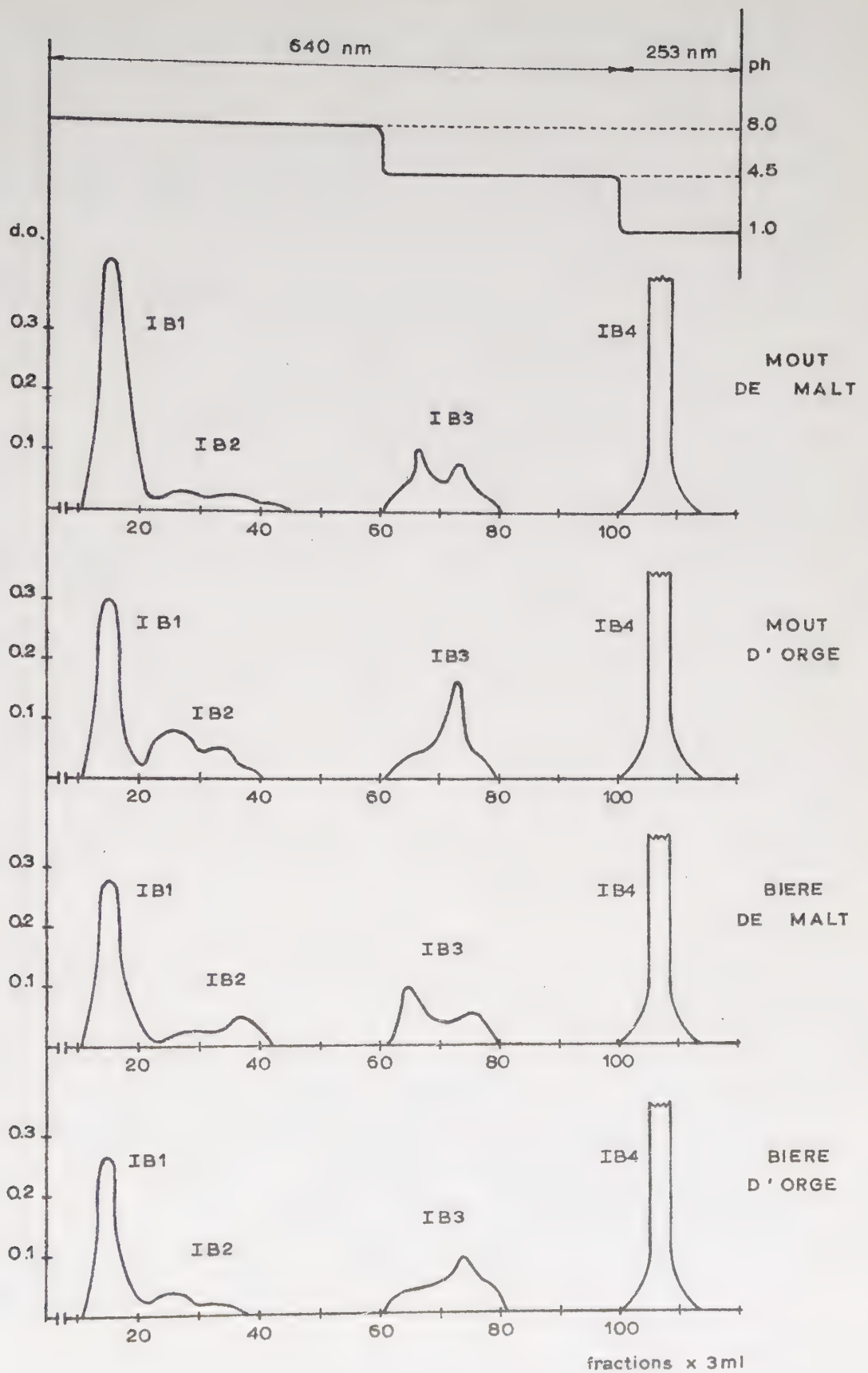


Figure N° 5. CHROMATOGRAPHIE DES CHELATES SUR
DEAE CELLULOSE

g) FRACTION IB2.

(Résultats repris des tableaux 2 à 13 p.73,79 et 85)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	9,0	- 69	2,8
≠ %	+ 92		+232
Orge	17,3	- 46	9,3

2) Azote α -aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhy- drine	Malt	2,35	- 78	0,52
	≠ %	+ 56		+225
	Orge	3,67	- 54	1,69
TNBS	Malt	2,14	- 74	0,55
	≠ %	+ 73		+311
	Orge	3,71	- 39	2,26

3) Commentaires

La complexité de cette fraction indiquée par le rapport azote α -aminé avant et après hydrolyse montre que l'on est en présence d'un mélange où di- et tripeptides doivent être en majorité. L'allure de cette seconde fraction (voir fig.5 p.98) lors de la séparation des ché-
lates sur DEAE cellulose semble indiquer une certaine hétérogénéité. Le moût d'orge renferme donc beaucoup plus de ces peptides que le moût de malt, il est vrai cependant que les valeurs absolues sont très faibles comparées à celles des acides aminés de la première fraction, principalement pour le malt.

A nouveau un point remarquable est à souligner. Des quantités identiques de ces peptides simples des moûts de malt et des moûts d'orge sont assimilées durant la fermentation, malgré le fait que l'assimilation des acides aminés pour le moût de malt avait été double de celle du moût d'orge, il n'y aurait donc pas compétition entre l'assimilation des aminoacides et des peptides par la levure.

h) FRACTION IB₃.

(Résultats repris des tableaux 2 à 13 p.73,79 et 85)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	9,1	- 47	4,8
≠ %	+ 53		+ 54
Orge	13,9	- 47	7,4

2) Azote α-aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhy- drine	Malt	1,07	- 68	0,34
	≠ %	+ 15		+ 91
	Orge	1,23	- 47	0,65
TNBS	Malt	1,14	- 47	0,60
	≠ %	+ 31		+ 18
	Orge	1,49	- 52	0,71

3) Commentaires

La complexité moyenne de ces fractions IB₃ se situe entre 5 et 6, elles sont constituées vraisemblablement d'une majorité de tétra-, penta-, hexa- et heptapeptides.

Plus importantes dans le moût d'orge, elles se réduisent de moitié dans la bière.

i) FRACTION IB₄.

(Résultats repris des tableaux 2 à 13 p.73,79 et 85)

1) Azote total : mg/100 ml.

	Moût	≠ %	Bière
Malt	7,8	+ 32	10,3
≠ %	- 23		- 14
Orge	6,0	+ 48	8,9

2) Azote α-aminé : mg/100 ml.

		Moût	≠ %	Bière
Ninhydrine	Malt	0,35	+ 40	0,49
	≠ %	- 20		- 18
	Orge	0,28	+ 43	0,40
TNBS	Malt	0,33	+ 85	0,61
	≠ %	- 15		- 33
	Orge	0,28	+ 46	0,41

3) Commentaires

Cette fraction IB₄ dont la complexité moyenne est de 12 à 13 dans le moût, est la seule fraction qui augmente dans la bière, cet accroissement s'accompagnant d'une diminution de la complexité moyenne 9 à 10 dans la bière.

Ce fait est inattendu,,en effet s'il est bien connu que la levure assimile et excrète des peptides, il fut toujours considéré que ces peptides excrétés étaient très simples, ce phénomène serait donc moins surprenant s'il était apparu dans la fraction IB₂ et à l'extrême IB₃.

Clapperton (115) classe dans cette fraction les nucléotides, nous avons rejeté cette hypothèse pour deux raisons : il est peu vraisemblable que les nucléotides soient absorbés par la résine cationique.

IR 120, les nucléotides passent dans la fraction IA, enfin tout dans nos résultats montre qu'il doit s'agir réellement d'azote peptidique en effet les azotes α -aminés avant et après hydrolyse croissent parallèlement à l'azote total (voir fig.6 p.110).

Ceci nous porte devant une alternative :

a) ces peptides proviennent d'une hydrolyse des protéines ou des polypeptides du moût, cette éventualité ne peut être rejetée à priori mais nous ne voyons pas bien quel pourrait en être le mécanisme.

b) ces peptides proviennent d'une excrétion de la levure, c'est l'hypothèse la plus logique et elle est fortement étayée par l'étude de Clapperton (117) qui montre qu'après croissance sur milieu synthétique ne contenant que le sulfate d'ammonium comme source azotée, la levure excrète des aminoacides et des peptides dans l'ordre décroissant suivant IB1, IB4, IB3, IB2, ceci expliquerait en outre la diminution de complexité pendant la fermentation, par un simple échange.

Notons enfin que cette fraction contient en outre les aminoacides dicarboxyliques, l'acide glutamique et l'acide aspartique, lesquels contenus en faible quantité peuvent contribuer à une légère diminution de la complexité.

3. CONCLUSIONS

Le profil peptidique comparatif entre moûts d'orge et de malt et des bières issues de ces moûts a été établi (voir tableaux récapitulatifs No.14 à 17 p.106 à 109 et fig.6 p.110), il présente des variations importantes entre moûts d'orge et de malt.

Explication des tableaux 14 à 17

Colonne 1 : fraction obtenue selon le schéma No.3 p.69.

Colonne 2 : Azote α -aminé, résultats finaux des tableaux 6 à 9 p.79 à 82.

Colonne 3 : Azote α -aminé après hydrolyse, résultats repris des tableaux 10 à 13 p.85 à 88 et recalculés en fonction des résultats finaux de la colonne 2.

Colonne 4 : Azote total, résultats finaux des tableaux 2 à 5 p.73 à 76.

Colonne 5 : Rapport entre les azotes α -aminés après et avant hydrolyse, ces chiffres reflètent l'ordre de grandeur moyen du nombre de liaisons peptidiques de la fraction.

Colonne 6 : Rapport entre l'azote total et l'azote α -aminé après hydrolyse, donne l'ordre de grandeur de l'azote non peptidique contenu dans chaque fraction.

Explication des graphiques de la fig.6

Les surfaces sont proportionnelles aux azotes totaux et α -aminés avant et après hydrolyse.

Chaque fraction est un secteur, en d'autres termes l'azote α -aminé avant hydrolyse est compris dans l'azote α -aminé après hydrolyse, lui-même compris dans l'azote total.

Les conclusions générales suivantes peuvent être tirées :-

1. Nous avons confirmé que les aminoacides sont en concentration plus élevée dans les moûts de malt, que dans les moûts d'orge, cette différence diminue entre les bières correspondantes.
2. Cette différence de l'azote α -aminé est légèrement compensée par les peptides des moûts et bières d'orge, ce qui entraîne des rapports très différents entre l'azote des aminoacides et celui des peptides.

	$\frac{IB1}{IB2}$	$\frac{IB1}{IB2+IB3}$	$\frac{IB1}{IB2+IB3+IB4}$
- Moût de malt	5,8	2,9	2,0
- Moût d'orge	1,4	0,8	0,7
- Bière de malt	10,2	3,7	1,6
- Bière d'orge	1,9	1,1	0,7

3. De même le rapport protéines (IA1) sur polypeptides (IA2) est plus élevé pour moût et bière d'orge alors que le rapport entre azote complexe (IA) et azote simple (IB) est le même.

	$\frac{IA1}{IA2}$	$\frac{IA}{IB}$
- Moût de malt	0,5	0,6
- Moût d'orge	1,1	0,6
- Bière de malt	0,5	0,8
- Bière d'orge	1,2	0,8

Il s'ensuit que les protéases que nous avons utilisées fournissent des produits azotés quantitativement différents de ceux élaborés pendant le maltage. La partie suivante de notre étude consistera à rechercher une protéase capable de rapprocher les profils azotés des moûts d'orge et de malt, c'est-à-dire dont l'action exopeptidasique sera supérieure à celle des enzymes utilisées dans notre étude.

Tableau 14.

RESUME DES RESULTATS

=====

MOUT DE MALT

	Fraction	1 N $\times$ NH ₂ av.hydrol. mg/100 ml.	2 N $\times$ NH ₂ ap.hydrol. mg/100 ml.	3 N mg/100 ml.	4 Rapport 2/1	5 Rapport 3/2
N i n h y d r i n e	I	29,5	-	123,0	-	-
	IA	2,8	-	45,1	-	-
	IA1	-	-	14,6	-	-
	IA2	-	-	30,5	-	-
	IB	26,7	42,51	77,9	1,59	1,8
	IB1	22,93	27,52	52,0	1,20	1,9
	IB2	2,35	5,24	9,0	2,23	1,7
	IB3	1,07	5,40	9,1	5,05	1,7
	IB4	0,35	4,35	7,8	11,77	1,8
T N B S	I	34,0	-	123,0	-	-
	IA	3,9	-	45,1	-	-
	IA1	-	-	14,6	-	-
	IA2	-	-	30,5	-	-
	IB	30,1	44,40	77,9	1,47	1,8
	IB1	26,49	29,93	52,0	1,13	1,7
	IB2	2,14	5,24	9,0	2,45	1,7
	IB3	1,14	5,16	9,1	4,53	1,8
	IB4	0,33	4,07	7,8	12,33	1,9

voir explications p.104.

Tableau 15.

RESUME DES RESULTATS

MOUT D'ORGE

	Fraction	1 N O -NH ₂ av.hydrol. mg/100 ml.	2 N O -NH ₂ ap.hydrol. mg/100 ml.	3 N mg/100 ml.	4 Rapport 2/1	5 Rapport 3/2
N i n h y d r i n e	I	20,8	-	101,5	-	-
	IA	4,2	-	39,4	-	-
	IA1	-	-	20,2	-	-
	IA2	-	-	19,2	-	-
	IB	16,6	34,27	62,1	2,06	1,8
	IB1	11,42	13,02	24,9	1,14	1,9
	IB2	3,67	9,29	17,3	2,53	1,9
	IB3	1,23	8,30	13,9	6,75	1,7
	IB4	0,28	3,66	6,0	13,08	1,6
T N B S	I	23,0	-	101,5	-	-
	IA	5,5	-	39,4	-	-
	IA1	-	-	20,2	-	-
	IA2	-	-	19,2	-	-
	IB	17,5	32,34	62,1	1,85	1,9
	IB1	12,02	14,30	24,9	1,19	1,7
	IB2	3,71	7,68	17,3	2,07	2,2
	IB3	1,49	6,78	13,9	4,55	2,0
	IB4	0,28	3,58	6,0	12,78	1,7

voir explications p.104.

Tableau 16.

RESUME DES RESULTATS

=====

BIERE DE MALT

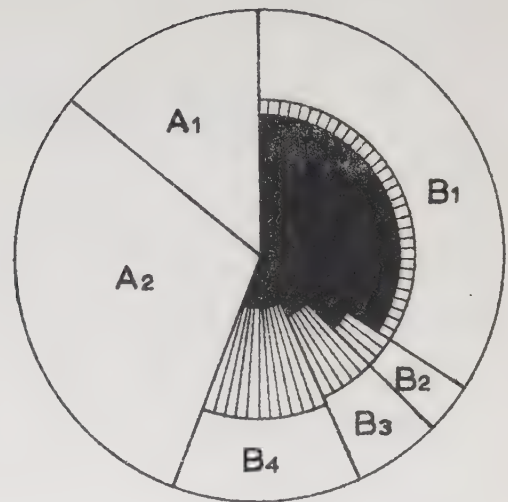
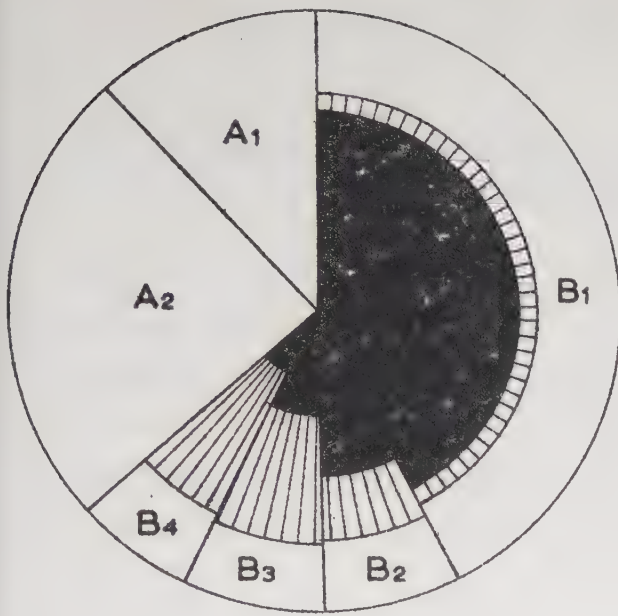
	Fraction	1 N α -NH ₂ av.hydrol. mg/100 ml.	2 N α -NH ₂ ap.hydrol. mg/100 ml.	3 N mg/100 ml.	4 Rapport 2/1	5 Rapport 3/2
N i n h y d r i n e	I	11,1	-	83,4	-	-
	IA	0,3	-	36,9	-	-
	IA1	-	-	11,6	-	-
	IA2	-	-	25,3	-	-
	IB	10,8	19,67	46,5	1,82	2,4
	IB1	9,45	11,91	28,5	1,26	2,4
	IB2	0,52	1,12	2,8	2,16	2,5
	IB3	0,34	1,99	4,9	5,88	2,4
	IB4	0,49	4,65	10,3	9,48	2,2
T N B S	I	13,5	-	83,4	-	-
	IA	0,5	-	36,9	-	-
	IA1	-	-	11,6	-	-
	IA2	-	-	25,3	-	-
	IB	13,0	23,11	46,5	1,77	2,0
	IB1	11,24	13,60	28,5	1,21	2,1
	IB2	0,55	1,32	2,8	2,40	2,1
	IB3	0,60	2,63	4,9	4,38	1,8
	IB4	0,61	5,56	10,3	9,12	1,9

voir explications p.104.

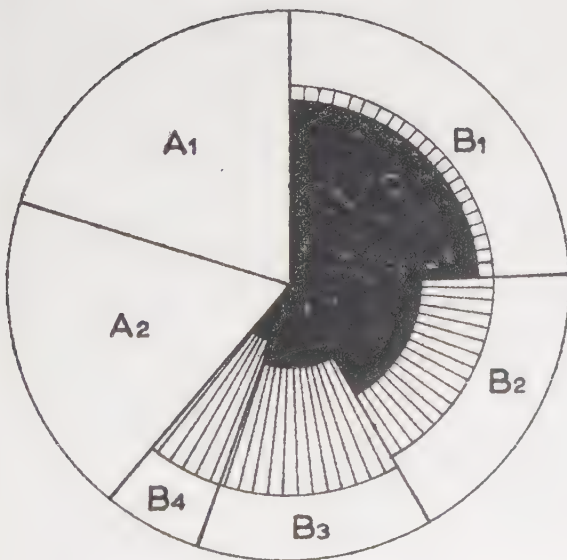
Tableau 17.

RESUME DES RESULTATS						
=====						
<u>BIERE D'ORGE</u>						
	Fraction	1 N α -NH ₂ av.hydrol. mg/100 ml.	2 N α -NH ₂ ap.hydrol. mg/100 ml.	3 N mg/100 ml.	4 Rapport 2/1	5 Rapport 3/2
N i n h y d r i n e	I	9,6	-	78,3	-	-
	IA	1,0	-	35,1	-	-
	IA1	-	-	18,9	-	-
	IA2	-	-	16,2	-	-
	IB	8,6	19,68	43,2	2,29	2,2
	IB1	5,86	7,91	17,6	1,35	2,2
	IB2	1,69	4,23	9,3	2,50	2,2
	IB3	0,65	3,37	7,4	5,18	2,2
	IB4	0,40	4,17	8,9	10,43	2,1
T N B S	I	10,8	-	78,3	-	-
	IA	1,2	-	35,1	-	-
	IA1	-	-	18,9	-	-
	IA2	-	-	16,2	-	-
	IB	9,6	21,78	43,2	2,27	2,0
	IB1	6,22	7,96	17,6	1,28	2,2
	IB2	2,26	5,60	9,3	2,48	1,7
	IB3	0,71	3,86	7,4	5,43	1,9
	IB4	0,41	4,36	8,9	10,63	2,0

voir explications p.104.



MOUT D'ORGE



BIERE D'ORGE

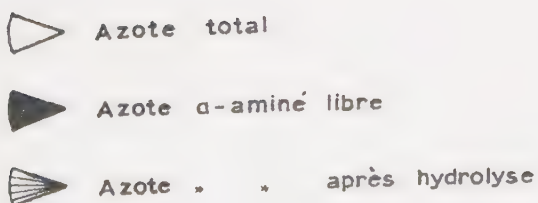
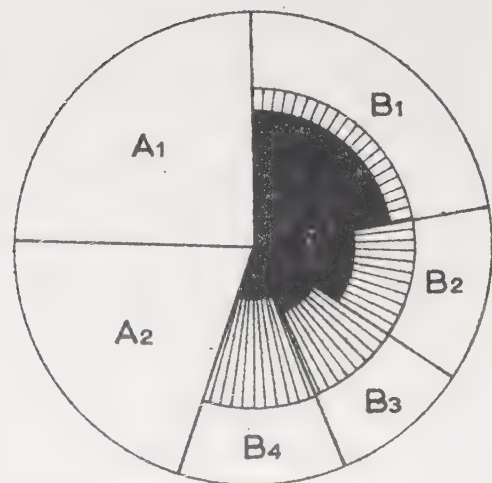


Figure N° 6

REPARTITION DE L' AZOTE

B). RECHERCHE D'UNE PROTEASE IDOINE A REMPLACER LE MALTAGE.

=====

Nous avons établi une série de brassins d'orge avec la panoplie d'enzymes protéolytiques qu'a bien voulu mettre à notre disposition le Professeur Masschelein; dans les douze brassins testés nous nous sommes limités à la détermination de l'azote total et de l'azote α -aminé pour établir nos premières comparaisons, malheureusement aucune de ces enzymes n'a montré une activité exopeptidasique supérieure à ce que nous avons obtenu par l'action synergique de la papaïne et d'une protéase bactérienne.

Nous avons étudié en détails le moût et la bière produits par la protéase P7 de cette collection laquelle semblait donner les meilleurs résultats, ceux-ci sont repris dans le tableau 18 p.112.

Comme le TNBS ne semblait pas apporter de résultats supplémentaires à ceux de la ninhydrine, cette dernière seule a été utilisée.

Cette enzyme P7 ne présente pas d'avantage sur les enzymes utilisées auparavant; en effet si en valeur absolue les aminoacides sont légèrement plus abondants, en valeur relative s'est dissout un plus petit pourcentage de l'azote total, 21 contre 25% et les conclusions des essais précédents restent les mêmes (p.105) : les profils azotés des moûts d'orge n'ont pas changé en effet les rapports acides aminés/peptides IB1/IB2, IB1/IB2+IB3, IB1/IB2+IB3+IB4 sont semblables, il en va de même pour les rapports IA1/IA2 et IA/IB qui représentent les rapports protéines/polypeptides et azote complexe/azote simple.

Il s'ensuit qu'un moût ou une bière d'orge a des caractéristiques azotées bien différentes comme nous pouvons le voir sur le tableau récapitulatif No.19 p.113.

Tableau 18.

ORGE + ENZYME A7
=====

	Fraction	1 N α -NH ₂ av.hydrol. mg/100 ml.	2 N α -NH ₂ ap.hydrol. mg/100 ml.	3 N mg/100 ml.	4 Rapport 2/1	5 Rapport 3/2
M O U T	I	23,6	-	140,0	-	-
	IA	2,9	-	72,6	-	-
	IA1	-	-	35,5	-	-
	IA2	-	-	37,1	-	-
	IB	20,7	39,81	67,4	1,92	1,7
	IB1	14,03	16,56	29,0	1,18	1,7
	IB2	4,79	10,87	18,2	2,27	1,7
	IB3	1,34	7,30	12,2	5,45	1,7
	IB4	0,54	5,08	8,0	9,42	1,6
B I E R E	I	10,5	-	84,2	-	-
	IA	0,9	-	43,7	-	-
	IA1	-	-	19,4	-	-
	IA2	-	-	24,3	-	-
	IB	9,6	19,40	40,5	2,02	2,1
	IB1	6,88	8,57	18,0	1,25	2,1
	IB2	1,68	3,57	7,5	2,12	2,1
	IB3	0,42	2,12	4,2	5,03	2,0
	IB4	0,62	5,14	10,8	8,23	2,1

voir explications p.104.

Tableau 19.

RAPPORTS ENTRE LES DIFFERENTES FRACTIONS AZOTEES.

Rapport des fractions	Moût			Bière		
	Malt	Orge (B500+ Pap.)	Orge (P7)	Malt	Orge (B500+ Pap.)	Orge (P7)
$\frac{IB1}{IB2}$	5,8	1,4	1,6	10,2	1,9	2,4
$\frac{IB1}{IB2+IB3}$	2,9	0,8	0,9	3,7	1,1	1,5
$\frac{IB1}{IB2+IB3+IB4}$	2,0	0,7	0,8	1,6	0,7	0,8
$\frac{IA1}{IA2}$	0,5	1,1	1,0	0,5	1,2	0,8
$\frac{IA}{IB}$	0,6	0,6	1,1	0,8	0,8	1,1

B500, Pap. et P7 sont les protéases qui ont servi aux brassins (voir p.44)

IB1 = aminoacides.

IB2 = peptides (composition moyenne ca. 2 aminoacides)

IB3 = " (" 5 ")

IB4 = " (" 10 ")

IB = IB1 + IB2 + IB3 + IB4 = azote simple

IA1 = protéines

IA2 = polypeptides

IA = IA1 + IA2 = azote complexe

C). COMPOSITION EN NUCLEOTIDES DES BIERES DE MALT ET D'ORGE

1. ETABLISSEMENT D'UNE METHODE DE TRAVAIL

Alors que le fractionnement et le dosage d'une solution pure de nucléotides ne présentent aucune difficulté, leur dosage dans les moûts et les bières est rendu très difficile par les substances non nucléiques qu'ils renferment.

a) Purification

La méthode mise au point par Vanhemmens (p.57) absorption des polyphénols sur AT suivie d'ultrafiltration ne convient qu'aux bières de malt.

Il nous fut impossible d'ultrafiltrer les moûts et la bière d'orge par ce procédé, nous avons dû joindre un traitement préalable à l'acétone qui élimine entre autres des β -glucanes, ce traitement n'affecte en rien les nucléotides, les résultats sur bière de malt étaient les mêmes avec ou sans traitement à l'acétone. Cette technique nous a permis d'ultrafiltrer la bière d'orge, quant aux moûts nous avons été dans l'impossibilité de les purifier, nous nous sommes heurtés aux mêmes difficultés que Martin (180) nos essais par extraction, précipitation, centrifugation, filtration, ultrafiltration, chromatographie préparative sur résines, sur charbon actif sont restés inopérants et nous avons dû nous limiter aux bières.

b) Séparation des nucléotides et dosage

La séparation sur Dowex et le dosage des nucléotides purifiés ne présentent pas de difficultés. Leur concentration doit être suffisante, en effet la bière n'en renferme que de petites quantités, il faut donc concentrer l'échantillon cent fois pour se trouver dans les conditions analytiques adéquates.

Nous avons donc traité chaque fois deux cents millilitres, ce volume relativement important est un obstacle supplémentaire à la purification, opération déjà fastidieuse.

2. ANALYSE DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

Trois nucléotides se trouvent à des concentrations mesurables (cfr. fig.7 p.117) les pics II, III, VIII, les nucléotides renfermés dans les pics I, IV, V, VI, VII et IX se trouvaient à des concentrations inférieures à 1 ppm et n'ont pu être dosés.

Résultats

Pic	Nucléotide	Nucléotide mg/l	Partie azotée mg/100 ml
1. Bière de malt			
II	CMP5'	8,1	0,070
III	CMP3'	13,6	0,118
VIII	GMP5'	<u>14,9</u>	<u>0,287</u>
	Total	36,6	0,475
2. Bière d'orge			
II	CMP5'	11,7	0,101
III	CMP3'	15,2	0,132
VIII	GMP5'	<u>19,3</u>	<u>0,371</u>
	Total	46,2	0,604

Qualitativement les résultats sont identiques pour bières de malt et d'orge, cette dernière cependant est sensiblement plus riche, 44% pour la cytidine monophosphate 5', 12% pour la cytidine monophosphate 3' et 30% pour la guanosine monophosphate 5', soit en moyenne 25%.

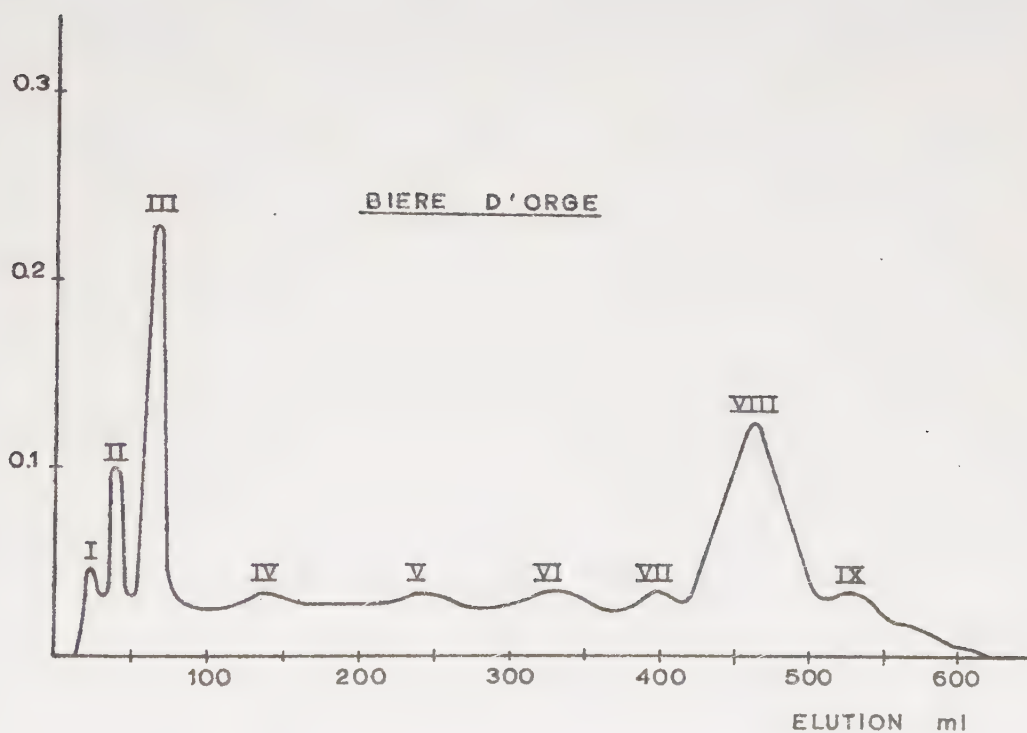
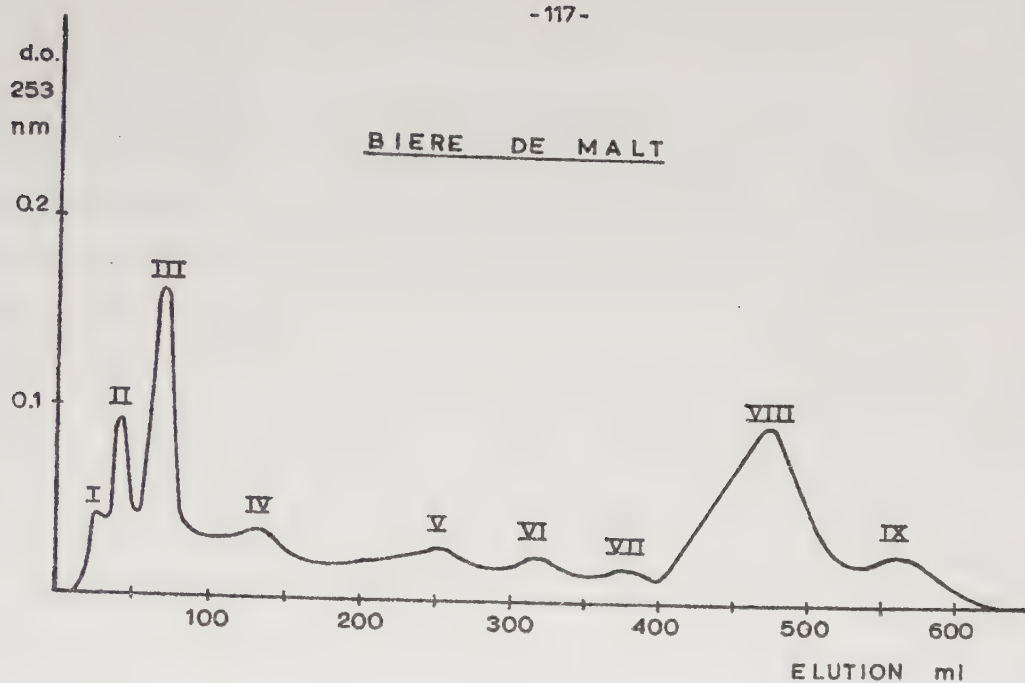


Figure № 7. CHROMATOGRAPHIE DES NUCLEOTIDES
SUR DOWEX 1-x8

Comme nous avons été incapables de doser ces nucléotides dans le moût il nous est malaisé d'interpréter ces résultats, nous ne pouvons définir leur source, moût ou levure, la seule constatation valable est que dans les deux cas le profil est identique avec seulement quelques variations quantitatives.

Dans notre tableau des résultats nous avons calculé la part azotée pour 100 ml. de bière provenant des nucléotides, elle représente 0,6% pour la bière de malt et 0,8% pour la bière d'orge de l'azote total. Ces résultats sont très faibles et nous regrettons vivement d'ignorer la quantité renfermée dans les moûts, qui selon la littérature (voir revue bibliographique p.5) serait de plusieurs % en matériel nucléique. Une étude du profil des nucléotides même si nous avons été capables de les doser dans le moût ne serait vraiment complète que si elle s'étendait aux nucléosides et aux bases puriques et pyrimidiques, malheureusement l'arsenal analytique actuel est déficient à ce sujet pour le moût et la bière.

VI. DISCUSSION GENERALE

=====

Bien que lors des attaques protéolytiques de l'orge, nous avons l'avantage de jouer sur une série de paramètres tels que ph, temps, température, choix et concentration de la protéase, qui durant le maltage sont fixes ou peu sujets à variation, nous ne sommes pas arrivés à atteindre des résultats voisins de ceux du malt. L'arsenal protéolytique que se crée l'orge durant le maltage en est la cause, il est de loin supérieur à la panoplie des protéases microbiennes ou végétales que nous avons à notre disposition et qui sont toutes des endopeptidases. Les exopeptidases industrielles font entièrement défaut et cette carence est responsable des différences obtenues.

En effet en jouant sur les différents paramètres, nous pouvons atteindre un but fixé, obtenir une quantité prédéterminée d'azote simple ou d'azote complexe, mais non les deux simultanément ainsi que nous l'avons montré avec différentes protéases. A toute dissolution d'azote simple se dissoudront parallèlement des quantités d'azote à tous les degrés de complexité, si bien que les rapports resteront plus ou moins constants.

La possession d'une exopeptidase remédierait en effet à cette situation. L'azote complexe du moût d'orge est constitué d'une part, des albumines et des globulines qui se mettent automatiquement en dissolution dans les conditions d'une maische et sur lesquelles on ne peut guère jouer, et d'autre part de produits de dégradation des prolamines et glutélines solubilisés par l'endopeptidase industrielle laquelle peut être ajustée pour donner une quantité d'azote préalablement fixée. L'ajoute de l'exopeptidase pourrait se faire simultanément à celle de l'endopeptidase ou à un stade ultérieur, après filtration par exemple, si l'on veut arrêter toute élévation de l'azote total. A notre connaissance une telle exopeptidase d'origine microbienne ou végétale n'est pas disponible, comme toutes les exopeptidases sont intracellulai-

res chez les microorganismes, la solution serait vraisemblablement à rechercher du côté des végétaux où l'extraction est plus facile, leur paroi cellulaire étant plus fragile. Une telle découverte est souhaitable.

Quelles peuvent être les conséquences d'une telle différence entre moûts de malt et moûts d'orge? En ce qui concerne la croissance de la levure, une dizaine de fermentations successives n'ont présenté aucune difficulté. A ce niveau cependant nous avons vu que l'assimilation de la levure est différente, il disparaît beaucoup plus d'acides aminés et de peptides des moûts de malt que des moûts d'orge, si bien que dans les bières correspondantes les différences s'estompent, mais ceci ne signifie pas que des différences éventuelles du goût iront dans le même sens, il faut considérer ce que sont devenus ces produits métabolisés : alcools supérieurs? peptides excrétés?

Si l'assimilation des acides aminés par la levure a engendré une littérature abondante ainsi qu'en fait foi notre revue bibliographique, elle est relativement discrète en ce qui concerne le métabolisme ou l'excrétion des peptides (182). Nous avons montré cependant que régnait à ce niveau une activité importante qui mériterait qu'on lui consacre une étude spéciale. Quel est le mécanisme d'assimilation des peptides? A notre avis deux hypothèses sont valables, ou bien par un jeu de perméases à l'image des acides aminés ces peptides pénètrent entiers dans la cellule par un mécanisme semblable mais inverse de celui qui régit l'excrétion. Ou bien les peptides sont d'abord convertis en acides aminés au niveau de la paroi cellulaire puisqu'il a été démontré que la levure n'avait pas d'activité protéolytique extra cellulaire, ni endo-, ni exopeptidasique.

Dans cette étude nous avons comparé moûts et bières d'orge à moûts et bières de malt pur, dans nos pays ce n'est pratiquement jamais le cas car à côté du malt sont utilisés des produits non azotés tels que saccharose, glucose ou pauvres en azote tels que riz et maïs. Des moûts et bières préparés à partir d'un pourcentage d'un tel extrait se

rapprocheront globalement des moûts et bières d'orge, mais l'équilibre azoté bien sûr sera toujours aussi différent. Nous aimerions souligner que la protéine la plus importante du maïs, la zéine intervient peu dans l'apport azoté, elle est aussi pratiquement insensible aux protéases (165).

Par souci d'obtenir un produit régulier, bien souvent le brasseur s'est fixé un taux d'azote dans le moût et il tâche de le maintenir aussi constant que possible, pour ce il a deux armes à sa disposition, utiliser des malts dont l'azote soluble en % de l'extrait au ph de la maische soit 5,6 est constant, ou si ce n'est pas le cas le régler par mélange de malts ou le corriger par une plus ou moins grande quantité de grains crus. Une telle pratique est de loin supérieure à une utilisation anarchique des matières premières, une meilleure approche du problème est de fixer un second facteur la concentration en azote α -aminé de la même manière. Dans ce cas le rapport azote total sur azote α -aminé devrait être voisin de 4 pour un moût de malt, il varie de 5 à 6 pour les moûts d'orge. Mais nous avons vu que les rapports entre aminoacides et peptides varient dans des proportions beaucoup plus importantes 6-3-2 pour le malt contre 1,5-0,9-0,7 pour l'orge selon les différentes classes de peptides (voir tableau 19 p.113).

Nous ne recommanderons pas bien sûr de fixer les six fractions qui ont servi à l'examen du profil azoté, c'est une méthode de recherche qui ne peut être appliquée telle quelle dans un contrôle de routine. Nous croyons toutefois qu'à la lumière de ce qui précède une méthode qui donne l'azote α -aminé des seuls aminoacides à l'exclusion des peptides polypeptides et protéines serait un outil précieux, cette méthode malheureusement reste à découvrir.

Il nous reste à envisager l'action des inhibiteurs des protéases tels que l'a décrits Enari (p.39), il semble que leur action peut être contrecarrée par l'utilisation de plus fortes concentrations d'enzymes, pour éviter ceci Petit (165) a montré qu'il serait possible de jouer

sur la solubilité de ceux-ci, empâter la farine d'orge, transférer après décantation une maische liquide qui contiendrait la majeure partie des inhibiteurs, attaquer ensuite enzymatiquement le métier.

Quant aux nucléotides de la bière, nous savons (171) qu'ils sont variables d'une bière à l'autre avec des différences plus grandes que celles que nous avons obtenues entre bière d'orge et bière de malt. Ces différences probablement proviennent de la levure utilisée mais pourraient aussi provenir des conditions dans lesquelles les levures ont crû. Il se fait que les moûts d'orge ont fermenté plus lentement que les moûts de malt, et ceci pourrait expliquer cela. Comme malheureusement nous avons été incapables de doser quantitativement les nucléotides dans le moût, il nous est difficile d'expliquer ces différences.

D'un point de vue analytique, nous pouvons conclure qu'une méthode d'investigation de l'azote protéique a été mise au point, donnant des résultats reproductibles et corrects. En ce qui concerne l'azote nucléique une telle méthode fait défaut.

VII. RESUME

=====

Nous avons mis au point une méthode de fractionnement et d'analyse de l'azote peptidique qui nous a permis de démontrer que par brassage d'orge avec des protéases industrielles, les moûts et les bières produits ont une composition azotée relativement différente de ceux de la production classique où l'orge est maltée.

La différence provient principalement de la répartition de l'azote α -aminé, tant qu'une exopeptidase industrielle n'aura pu être produite, du type par exemple des carboxypeptidases isolées du malt par Enari, les brassins avec cent pour cent d'orge risqueront d'amener des résultats qualitatifs différents, c'est pourquoi dans les conditions actuelles nous pensons qu'il est sage si l'on veut utiliser de l'orge au brassage, de l'utiliser conjointement avec une certaine proportion de malt, technique que le brasseur a généralement adoptée. Accessoirement nous estimons qu'une β -glucanase ne peut être évitée lors du brassage de l'orge, les difficultés lors de l'ultrafiltration en sont une preuve supplémentaire.

Un phénomène intéressant de la fermentation est apparu, la levure ne semble pas assimiler et excréter seulement des acides aminés et des peptides simples mais également des peptides relativement complexes renfermant plus de dix aminoacides, cette utilisation des peptides est parallèle à celle des aminoacides et non successive. Ce mécanisme d'assimilation et d'excrétion mériterait une étude plus approfondie.

L'étude de l'azote nucléique du moût et de la bière est au stade embryonnaire, des techniques nouvelles devraient être mises au point afin d'en déterminer le profil à l'image de l'azote peptidique.

Enfin il nous faut reconnaître que par cette thèse nous avons posé plus de problèmes que nous n'en avons résolus.

III. BIBLIOGRAPHIE

=====

1. Lavallay J., Progrès en chimie agricole et alimentaire. Hermann Ed., Paris (1968).
2. Pollock J.R.A., Brauwiss., (1971), 24, 158.
3. Piendl A., The Brew. Digest (1971), May, 72.
4. Saletan L.T., Wallerst. Lab. Com. (1968), 31 (104), 33.
5. Mac Leod A.M., J. Inst. Brewing, (1965), 75, 417.
6. Mercier P.V., Fermentatio, (1970), 169.
7. Delecourt R., Rev. Ferm. et Ind. Aliment., (1970), 97.
8. Keay L., Die Stärke, (1970), 5, 153.
9. Enevoldsen B.S., J. Inst. Brewing, (1970), 76, 546.
10. Knorr F., Mitt. Versuchsstation Garungsgewerke Wien, (1971), 5/6, 104.
11. Keay L., Process Biochem. (1971), 8, 17.
12. Vogels R.J., Natuur en Techniek, (1972), 1, 46.
13. Baker J.L., Inst. Brewing, (1942), 48, 109.
14. Hudson J.R., Mac William I.C., Whitear A.L., J. Inst. Brewing (1963), 69, 303.
15. Hudson J.R., Mac William I.C., Biertwistle S.E., J. Inst. Brewing (1963), 69, 308.
16. Urion E., Bull. Assoc. Anc. Elèv. Ec. Brass. Nancy, (1965), 12, 420.
17. Linko M., Eklund E., Enari T.M., Proc. EBC. Stockholm, (1965), 105.
18. Mostek J., Dyr J. Brauwissenschaft, (1966), 19 (9), 358.
19. Macey A., Stowell K.C., White H.B., Proc. EBC. Madrid, (1967), 283.
20. Klopper W.J., Int. Tijds. voor Br. en Mout., (1967), 5, 143.
21. Wieg A.J., Hollo J., Process Biochem., (1967), 4(5), 33.
22. Stowell K.C., Brewers Guild J., (1967), 12, 620.
23. Enari T.M., Linko M., Tech. Quart M.B.A.A., (1967), 4(3), 182.
24. Harris J.O., Brewers Guardian, (1968), 5, 81.
25. Wieg A.J., Hollo J., Varga P., Process Biochem., (1969), 4, 33.
26. Klopper W.J., Brauwelt, (1969), 40, 753.
27. Klopper W.J., Bull. Assoc. Anc. Et. Brass. Un. Louvain, (1969), 65(2), 57.

28. Green S.R., Tech. Quart. M.B.A.A., (1969), 6(1), 33.
29. Vermeire H.A., Int. Tijds. voor Br. en Mout., (1969), 29 (3), 66.
30. Rainbow C., J. Inst. Brewing, (1969), 75, 419.
31. Witt P.R. Jr., Brew. Digest., (1970), 2, 48.
32. Bley W., Hofmann M., Löther H., J. Inst. Brewing, (1970), 76, 47.
33. Wieg A.J., Process Biochem., (1970), 8, 46.
34. Sorensen S.A., Process Biochem., (1970), 4, 60.
35. Noerr N.J., M.B.A.A. Distr. Carribean, (1971).
36. Stentebjerg - Olesen B., Process Biochem., (1971), 4, 29.
37. Nielsen E.B., Proc. EBC. Estoril, (1971), 149.
38. Laufer S., Davis C.F., Saletan L.T., Proc. A.S.B.C. (1942).
39. Norris F.W., J. Inst. Brewing, (1945), 51, 177.
40. Tullo J., Stringer W., J. Inst. Brewing, (1945), 51, 86.
41. Mac William I.C., J. Inst. Brewing, (1968), 74, 38.
42. Drews B., Just F., Drews H., Proc. EBC Copenhagen, (1957), 167.
43. Rabitzsch G., Planta Med., (1959), 7, 268.
44. Palemand S., Hardwick W., Markl K., Proc. A.S.B.C., (1969), 54.
45. Harrison G., J. Inst. Brewing, (1970), 76, 486.
46. Slaughter J., Uvgard A., J. Inst. Brewing, (1971), 77, 446.
47. Hopkins R.H., Amphlett P.H., Perridge N.J., J. Inst. Brewing, (1941), 47, 106.
48. Vendrely R., Biochem. Biophys. Acta, (1947), 1, 95.
49. Johnston J.H., J. Inst. Brewing, (1948), 56, 305.
50. Laufer L., Gutcho M., Stewart E., Mac Cully R., Proc. A.S.B.C., (1951), 68.
51. Harris G., Parsons R., J. Inst. Brewing, (1955), 61, 29.
52. Bolinder A., Kurz W., Lundin H., J. Inst. Brewing, (1955), 61, 497.
53. Ayräpää T., Proc. EBC. Copenhagen, (1957), 113.
54. Lee T., Lewis M., J. Food Sci., (1968), 33, 124.
55. Harris G., Davies J., Pearsons A., Nature, (1958), 183, 1565.
56. Higuchi M., Uemura T., Nature, (1959), 184, 1381.
57. Woskow M., Food Techn., (1969), 23, 32.
58. Rauen H., Biochemisches Tachenbuch Berlin, (1956), 408.

59. Malher H.R., Cordes E.H., Basic Biological Chemistry, N.Y. (1968).
60. Ostborne T.S., J. Am. Chem. Soc. (1895), 17, 539.
61. Rothfus J.A., J. Am. Oil. Chem. Soc., (1970), 47, 316.
62. Christianson D.D., Nielsen H.C., Khoo U., Wolf M.J., Wall J.S., Cereal. Chem., (1969), 46, 372.
63. Karon M.L., Adams M.E., Altschul A.M., J. Phys. and Colloid. Chem. (1950), 54, 56.
64. Courtois J., Barré R., Bull. Soc. Chim. Biol., (1949), 31, 740.
65. Barré R., Recherche sur les protéines. Thèse Sciences Paris (1953).
66. Rondelet J., Lontie R., Proc. EBC. Baden-Baden, (1955), 90.
67. Lontie R., Voets T., Proc. EBC. Rome, (1959), 27.
68. Mazon P., Krischer J., Metche M., Horn P., Urion E., Proc. EBC. Stockholm, (1965), 70.
69. Bishop L.R., J. Inst. Brewing, (1929), 35, 316.
70. Préaux G., Van Gijssels A., Robin C., Wouters F.A., Lontie R., Proc. EBC. Bruxelles, (1963), 59.
71. Quensel H.O., Untersuchungen über die Gerstenglobuline, Almquist und Wiksells, Uppsala, (1942).
72. Pool A.A., Shooter E.M., J. Sc. Food Agric., (1955), 6, 514.
73. Chollot B., Urion E., Proc. EBC. Rome, (1959), 45.
74. Scriban R., Les protides de l'orge, du malt et du moût, Lille, (1951).
75. Lontie R., Rondelet J., Dulcino J. Proc. EBC. Nice, (1953), 33.
76. Pollock J.R.A., Kirsop B.H., Pool A.A., Proc. EBC. Rome, (1959), 89.
77. Folkes B.F., Yemm E.W., New Phytol., (1958), 57, 106.
78. Schwimmer S., J. Biol. Chem., (1949), 179, 1073.
79. Reindel F., Belohlawck L., Brauwiss., (1961), 14, 89.
80. Biserte G., Scriban R., Bull. Soc. Chim. Biol., (1950), 32, 959.
81. Biserte G., Scriban R., Pet. J. Brass., (1951), 59, 6.
82. Biserte G., Scriban R., Brasserie, (1952), 7, 3.
83. Rondelet J., Lontie R., Proc. EBC. Nice, (1953), 22.
84. Waldschmidt-Leitz E., Proc. EBC. Rome, (1959), 37.
85. Waldschmidt-Leitz E., Proc. EBC. Vienne, (1961), 56.
86. Grabar P., Proc. EBC. Copenhagen, (1957), 147.

87. Grabar P., Daussant J., Proc. EBC. Bruxelles, (1963), 45.
88. Djurtoff R., Hill R.J., Proc. EBC Stockholm, (1965), 137.
89. Donhauser S., Proc. EBC. Madrid, (1967), 323.
90. Bateson J.B., Leach A.A., Proc. EBC. Interlaken, (1969), 161.
91. Drawert F., Radola B.J., Müller W., Görg A., Proc. EBC. Estoril, (1971), 479.
92. Lontie R., Petit J. Brass., (1959), 67, 779.
93. Enari T.M., Mikola J., Proc. EBC. Vienne, (1961), 56.
94. Djurtoff R., Proc. EBC. Vienne, (1961), 298.
95. Waldschmidt-Leitz E., Proc. EBC. Bruxelles, (1963), 78.
96. Biserte G., Dautrevaux M., Scriban R., Proc. EBC. Baden-Baden, (1955), 355.
97. Waldschmidt Leitz E., ~~Brutscheck~~ H., Brauwiss, (1955), 278.
98. Harris G., Barley and Malt, Cook, (1962), 431.
99. Kolbach P., William G., Woch. für Brauerei, (1934), 51, 57.
100. Lundin H., Schröderhelm J., Woch. für Brauerei, (1931), 48, 347.
101. Myrbäck K., Myrbäck S., Woch. für Brauerei, (1931), 48, 43.
102. Kolbach P., Buse R., Woch. für Brauerei, (1932), 50, 249.
103. Biserte G., Scriban R., Wall. Lab. Comm., (1953), 16, 339.
104. Hartong B., Woch. für Brauerei, (1937), 54, 33.
105. Shooter E., J. Inst. Brewing, (1956), 62, 51.
106. Jensen R., Proc. EBC. Nice, (1953), 74.
107. Kolbach P., Woch für Brauerei, (1928), 45, 446.
108. Moore S., Stein W., J. Biol. chem., (1948), 176, 367.
109. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Shinoda T., J. Biochem., (1960), 47, 654.
110. Bateson J.B., J. Inst. Brewing, (1970), 76, 150.
111. Biserte G., Scriban R., 2^e Congrès int. Ind. Ferm. Knokke, (1952), 127.
112. Nielsen N., Woch für Brauerei, (1935), 52, 259.
113. Biserte G., Pique M.-T., Scriban R., Proc. EBC. Copenhagen, (1957), 132.
114. Tommel D., Vliegenthart J., Penders T., Arens J., Biochem. J., (1968), 107, 335.

115. MacWilliam I.C., Clapperton J.F., Proc. EBC. Interlaken, (1969), 271.
116. Clapperton J.F., I. Inst. Brewing, (1971), 77, 36.
117. Clapperton J.F., J. Inst. Brewing, (1971), 77, 177.
118. Clapperton J.F., Proc. EBC. Estoril, (1971), 323.
119. Piendl A., Wagner D., Process Biochemistry, (1972), 4, 26.
120. Jones M., Pierce J.S., J. Inst. Brewing, (1967), 73, 583.
121. Jones M., Pierce J.S., Proc. EBC. Bruxelles, (1963), 101.
122. Jones M., Pierce J.S., J. Inst. Brewing, (1967), 73, 347.
123. Barret J., Kirsop B.H., J. Inst. Brewing, (1971), 77, 39.
124. Jones M., Pierce J.S., J. Inst. Brewing, (1964), 70, 307.
125. Jones M., Pierce J.S., Proc. EBC. Stockholm, (1965), 182.
126. Maule D., Pinnegar M., Portno A., Whitear A., J. Inst. Brewing, (1966), 72, 488.
127. Palmqvist U., Ayräpää T., J. Inst. Brewing, (1969), 75, 181.
128. Makinen W., Haikara A., Enari T.-M., Suomen Kemistilichti, (1970), 43, 446.
129. Van Belle M., Neo Badin M., De Clerck J., Vervack W., Bull. Anc. Et. Brass. Univ. Lv., (1971), 86.
130. Duteurtre B., Bourgeois C., Chollot B., J. Inst. Brewing, (1971), 77, 28.
131. Masschelein C., Dupont A., Jeunehomme C., Devreux A., J. Inst. Brewing, (1960), 67, 502.
132. Kringstad H., Olsen J., Proc. EBC. Baden-Baden, (1955), 318.
133. Kringstad H., Kilhovd J., Proc. EBC. Copenhagen, (1957), 67.
134. Enari T.-M., Mikola J., Proc. EBC. Madrid, (1967), 9.
135. Enari T.-M., Puputti E., Mikola J., Proc. EBC. Bruxelles, (1963), 37.
136. Erlanger B., Kokowsky N., Cohen W., Arch. Biochem. Biophys., (1916), 95, 271
137. Burger W., Prentice N., Kartenschmidt J., Moeller M., Phytochemistry, (1968), 7, 1261.
138. Preece I.A., J. Inst. Brewing, (1963), 69, 154.
139. Sandegreen E., Klang N., J. Inst. Brewing, (1950), 56, 313.
140. Kunitz M., J. Gen. Physiol., (1947), 30, 291.
141. Massart L., Fermentatio, (1946), 23.

142. Neurath H., Bradshaw R., Arch. Chem. Research, (1970), 8, 249.
143. Burger W., Prentice N., Moeller M., J. Inst. Brewing, (1971), 77, 285.
144. Burger W., Prentice N., Moeller M., J. Inst. Brewing, (1971), 77, 291.
145. Suolinna E., Mikola J., Enari T.-M., J. Inst. Brewing, (1965), 71, 519.
146. Bhatti R.S., J. Inst. Brewing, (1968), 74, 370.
147. Mikola J., Pietila K., Enari T.-M., Proc. EBC Estoril, (1971), 21.
148. Mikola J., Pietila K., Enari T.-M., J. Inst. Brewing, (1972), 78, 384.
149. Mikola J., Pietila K., Enari T.-M., J. Inst. Brewing, (1972), 78, 388.
150. Visuri K., Mikola J., Enari T.-M., Europ. J. Biochem. (1969), 7, 193.
151. Moeller M., Robbins G., Burger W., Prentice N., J. Agr. Food Chem., (1970), 18, 886.
152. Kolehmainen L., Mikola J., Arch. Biochem. Biophys., (1971), 145, 633.
153. Lunderström-Lang K., Sato M., Z. Physiol. Chem., (1929), 184, 83.
154. Wang M.L., Hesseltine C.W., Arch. Biochem. Biophys. (1970), 140, 459.
155. Keay L., Wildi B., Biotechnol. Bioeng., (1970), 12, 179.
156. Millet J., Bull. Soc. Chim. Biol., (1969), 51, 457.
157. Feder J., Schuck J.M., Biochemistry, (1970), 9, 2784.
158. Sluyterman L., Biochem. Biophys. Acta, (1964), 85, 316.
159. Lauwers A., Ruysen R., J. Pharm. Belg., (1965), 3, 11.
160. Klein I., Kirsch J., J. Biol. Chem., (1969), 244, 5923.
161. de Jersey J., Biochemistry, (1970), 9, 1761.
162. Enari T.-M., Mikola J., Linko M., J. Inst. Brewing, (1964), 70, 405.
163. Mikola J., Enari T.-M., J. Inst. Brewing, (1970), 76, 182.
164. Cousin G., Mémoire C.E.R.I.A. Bruxelles (1970).
165. Petit M., Mémoire C.E.R.I.A. Bruxelles (1971).
166. Masschelein C., Communication personnelle.
167. Analysis Committee of the EBC. (1970).

168. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Shinoda T., J. Biochemistry, (1960), 47, 654.
169. Moore S., Stein W.H., Methods Enzymol., (1963), 6, 819.
170. Roach D., Gehrke C.W., J. Chromatog., (1970), 52, 393.
171. Vanhemmens C., Mémoire C.E.R.I.A. Bruxelles, (1972).
172. Lento H.J., Ford J.A., Denton A.E., J. Food Science, (1964), 29, 435.
173. Umbreit W., Burris R., Stauffer J., Manometric Techniques, (1957), 272.
174. Bateson J.B., J. Inst. Brewing, (1970), 76, 150.
175. Djurtoft R., Proc. EBC. Vienna, (1961), 298.
176. Cerise L., Mémoire C.E.R.I.A. Bruxelles (1968).
177. Mengoli L., Mémoire C.E.R.I.A. Bruxelles (1970).
178. Somers T.C., Ziemelis G., J. Inst. Brewing, (1972), 78, 233.
179. Marshall J., J. Chromatography, (1970), 53, 379.
180. Martin C., Mémoire C.E.R.I.A. Bruxelles, (1971).
181. Lie S., J. Inst. Brewing, (1973), 79, 37.
182. Bourgeois C., Bios, (1970), mars.

=====

IX. LISTE DES ABREVIATIONS

=====

AMP	:	adénosine monophosphate
BAEA	:	benzoyl-arginine-éthylester
BAPA	:	benzoyl-arginine-p-nitronilide
CMP	:	cytidine monophosphate
DEAE	:	diéthylaminoéthyl
DFP	:	diisopropylfluorophosphate
EBC	:	European Brewery Convention
EDTA	:	acide éthylènediaminetétraacétique
GMP	:	guanosine monophosphate
IMP	:	inosine monophosphate
-NA	:	-naphtylamide
PCMB	:	acide p-chloromercuribenzoïque
TMP	:	thymidine monophosphate
TNBS	:	acide 2-4-6-trinitrobenzène-1-sulfonique
UMP	:	uridine monophosphate
Z-	:	carbobenzoxy-

